

附件 2

化妆品中甲醛的检测方法 (征求意见稿)

第一法 柱前衍生-高效液相色谱法

1 范围

本方法规定了柱前衍生-高效液相色谱-紫外检测器测定化妆品中游离甲醛含量。

本方法适用于液态水基类、膏霜乳液类、凝胶类和液态气雾剂类化妆品中游离甲醛含量的测定。

2 方法提要

样品中的游离甲醛与五氟苯肼反应，经高效液相色谱分离，在 255 nm 波长下检测，根据保留时间定性，峰面积定量，以标准曲线法计算含量。取 0.2 g 样品时，本方法对甲醛的检出浓度为 0.003%，最低定量浓度为 0.005%。

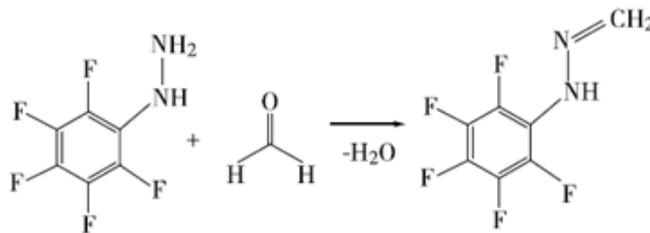


图 1 甲醛衍生化反应式

3 试剂

除另有规定外，所用试剂均为分析纯，水为实验室用一级水。

3.1 甲醛标准物质水溶液。

3.2 五氟苯肼，纯度 ≥ 98.0%。

3.3 二氯甲烷，色谱纯，含量 ≥ 99.9%。

3.4 磷酸，相对密度=1.685， ω (H₃PO₄) =85%，优级纯。

3.5 甲醇，色谱纯。

3.6 乙腈，色谱纯。

3.7 乙腈水溶液 (5+5): 量取乙腈 (3.6) 100 mL, 置锥形瓶中, 加水 100 mL, 摇匀, 即得。

3.8 磷酸溶液: 量取磷酸 (3.4) 2 mL, 置锥形瓶中, 加水至 1000 mL, 摇匀, 即得。

3.9 衍生溶液 A: 称取五氟苯肼 (3.2) 1.0 g, 置锥形瓶中, 用磷酸溶液 (3.8) 溶解并定容至 1000 mL, 摇匀, 即得。

3.10 衍生溶液 B: 称取五氟苯肼 (3.2) 1.0 g, 置锥形瓶中, 用乙腈水溶液 (3.7) 溶解并定容至 1000 mL, 摇匀, 即得。

3.11 甲醛系列标准溶液: 精密量取甲醛标准物质水溶液 (3.1) 适量, 用磷酸溶液 (3.8) 稀释成 10 μ g/mL、20 μ g/mL、50 μ g/mL、100 μ g/mL、200 μ g/mL、400 μ g/mL 的标准系列溶液。

4 仪器

4.1 高效液相色谱仪, 具有二极管阵列检测器, 配色谱工作站。

4.2 微量进样器或者自动进样装置。

4.3 分析天平。

4.4 离心机。

4.5 精密吸量管或精密移液器。

4.6 涡旋振荡器。

5 分析步骤

5.1 样品处理

5.1.1 适用于配方中不含遇酸分解产生甲醛的物质 (乌洛托品等) 的非液态气雾剂类样品

取样品 0.2g, 加入 10mL 衍生溶液 A(3.9), 涡旋处理 1 分钟, 离心, 取上清液 1mL, 加入 2mL 二氯甲烷, 涡旋处理 1min, 弃去上层溶液, 下层液用甲醇定容至 5mL, 作为待测溶液。

注: 配方中不含咪唑烷基脲和双羟基咪唑烷基脲的样品可以直接取上清液作为待测溶液。

5.1.2 适用于配方中含遇酸分解产生甲醛的物质 (乌洛托品等) 的样品以及液态气雾剂类样品

取样品 0.2g, 加入 10mL 乙腈, 涡旋处理 1 分钟, 离心, 取上清液 1mL, 加 2mL 衍生溶液 B (3.10), 涡旋处理 1min, 静置 30 分钟, 加入 3mL 二氯甲烷, 涡旋 1min, 离心, 弃去上层溶液, 取下层溶液作为待测溶液。

注: 配方中不含乌洛托品的样品可以取静置 30 分钟后的溶液作为待测溶液。

5.2 色谱参考条件

色谱柱：C₁₈ 色谱柱（250 × 4.6 mm，5 μm）；

流动相：甲醇+磷酸溶液（3.8）（60+40）；

流速：1.0 mL/min；

柱温：40 °C；

检测波长：255 nm；

进样体积：5 μL；

运行时间：25 min。

5.3 甲醛标准曲线溶液的制备

5.3.1 适用于配方中不含遇酸分解产生甲醛的物质（乌洛托品等）的非液态气雾剂类样品

精密量取甲醛系列标准工作溶液各 1 mL，分别加入 9 mL 衍生溶液 A(3.9)，涡旋处理 1 分钟，离心，取上清液 1 mL，加入 2 mL 二氯甲烷，涡旋处理 1 min，弃去上层溶液，下层液用甲醇定容至 5 mL，即得质量浓度为 50 μg/g、100 μg/g、250 μg/g、500 μg/g、1000 μg/g、2000 μg/g 的甲醛标准曲线溶液。

注：配方中不含咪唑烷基脲和双羟基咪唑烷基脲的样品可以直接取上清液作为待测标准曲线溶液。

5.3.2 适用于配方中含遇酸分解产生甲醛的物质（乌洛托品等）的样品以及液态气雾剂类样品

精密量取甲醛系列标准工作溶液各 1 mL，加入 9 mL 乙腈，涡旋处理 1 分钟，离心，取上清液 1 mL，加 2 mL 衍生溶液 B（3.10），涡旋处理 1 min，静置 30 分钟，加入 3 mL 二氯甲烷，涡旋 1 min，离心，弃去上层溶液，下层溶液即为质量浓度为 50 μg/g、100 μg/g、250 μg/g、500 μg/g、1000 μg/g、2000 μg/g 的甲醛标准曲线溶液。

注：配方中不含乌洛托品的样品可以取静置 30 分钟后的溶液作为待测标准曲线溶液。

5.4 测定

在“5.2”项色谱条件下，取“5.3”项下处理得到的标准曲线溶液分别进样，进行液相色谱分析，以系列标准溶液浓度为横坐标，甲醛衍生物五氟苯胺的峰面积为纵坐标，进行线性回归，建立标准曲线，得到回归方程。取“5.1”项下处理得到的待测溶液进样 5 μL，根据测定的甲醛衍生物五氟苯胺的峰面积，代入标准曲线计算游离甲醛的质量浓度。按“6”计算样品中游离甲醛的含量。

6 分析结果的表述

6.1 计算

按以上步骤操作,对同一样品独立进行测定获得的两次独立测试结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

$$\omega(\text{游离甲醛}) = \frac{\rho \times 0.2}{m \times 10^6} \times 100$$

式中： ω （游离甲醛）——化妆品中游离甲醛的含量，%；

m ——样品取样量，g；

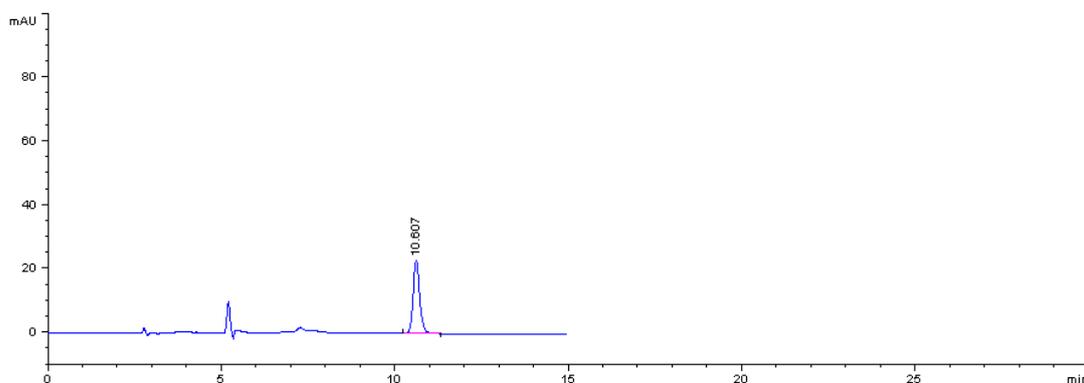
ρ ——代入标准曲线计算得到的样品中甲醛的质量浓度， $\mu\text{g/g}$ ；

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

6.2 回收率和精密度

平均回收率为 85.4% ~ 114.5%，相对标准偏差小于 10%。

7 色谱图



甲醛标准溶液衍生化反应后的高效液相色谱图

色谱峰：甲醛衍生物（五氟苯胺）（ $T_R=10.6\text{ min}$ ）

8 阳性结果确认

8.1 阳性样品可采用液相色谱-质谱法进行确证。

8.2 配方中含有甲醛释放体的不合格样品需采用第二法进行复核。

8.3 液相色谱-质谱法参考条件

仪器：Agilent 6495 三重四级杆质谱仪

色谱参考条件如下：

色谱柱：ZOBAX SB- C₁₈ 柱(2.1 mm×150 mm, 3.5 μm)，或等效色谱柱；

流动相 A：水；

流动相 B：乙腈；

流动相梯度洗脱程序：

表 1 流动相梯度洗脱程序

	Time	A	B	Flow
1	1.00 min	90.00 %	10.00 %	0.3 mL/min
2	3.00 min	40.00 %	60.00 %	0.3 mL/min
3	6.00 min	0.00 %	100.00 %	0.3 mL/min
4	8.00 min	0.00 %	100.00 %	0.3 mL/min
5	8.10 min	90.00 %	10.00 %	0.3 mL/min

流速：0.3 mL/min；

柱温：25 °C；

进样量：10 μL。

质谱参考条件如下：

离子源：电喷雾离子源（ESI 源）；

监测模式：负离子监测模式；

气流温度：160°C

鞘气温度：350°C

雾化气压力：30 psi；

毛细管电压：1500V；

碰撞气：氮气；

其它质谱条件参见下表：

表 2 三重四极杆离子对及相关电压参数设定表

物质名称	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	CE (V)
五氟苯胺	209	189	5
		167	17

用液相色谱-串联质谱法对样品进行定性判定，在相同试验条件下，样品中各离子对的保留时间应与标准溶液中各离子对的保留时间一致；样品色谱图中所选择的监测离子对的相对丰度比与相当浓度标准溶液的离子对相对丰度比的偏差不超过下表规定范围，则可以判断样品中存在甲醛。

表 3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度 (k)	$k \geq 50\%$	$50\% > k \geq 20\%$	$20\% > k \geq 10\%$	$k \leq 10\%$
允许的最大偏差	$\pm 20\%$	$\pm 25\%$	$\pm 30\%$	$\pm 50\%$

第二法 柱后衍生-高效液相色谱法

1 范围

本方法规定了柱后衍生-高效液相色谱-紫外检测器测定化妆品中游离甲醛含量。

本方法适用于液态水基类、膏霜乳液类、凝胶类化妆品中游离甲醛含量的测定，不适用于配方中含有遇酸分解产生甲醛（乌洛托品等）的物质的样品中游离甲醛的测定。

2 方法提要

样品中的游离甲醛经高效液相色谱分离，柱后衍生，在 420 nm 波长下检测，根据保留时间定性，峰面积定量，以标准曲线法计算含量。取 0.2 g 样品时，本方法对甲醛的检出浓度为 0.003%，最低定量浓度为 0.005%。

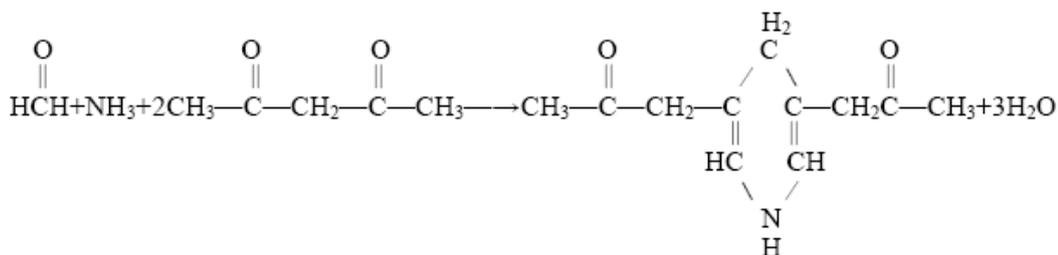


图 1 甲醛衍生化反应式

3 试剂

除另有规定外，所用试剂均为分析纯，水为实验室用一级水。

3.1 甲醛标准物质水溶液。

3.2 磷酸，相对密度=1.685， $\omega(\text{H}_3\text{PO}_4)=85\%$ ，优级纯。

3.3 乙酸铵。

3.4 乙酸， $\omega(\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2)=36\sim 37\%$ ，优级纯。

3.5 乙酰丙酮，相对密度=0.9753， $\omega(\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2)=99\%$ ，优级纯。

3.6 磷酸溶液：量取磷酸（3.2）2 mL，置锥形瓶中，加水至 1000 mL，摇匀，即得。

3.7 柱后衍生溶液：称取 62.5g 乙酸铵（3.3），置锥形瓶中，加入 7.5mL 乙酸（3.4），5mL 乙酰丙酮（3.5），用水定容至 1000mL，摇匀。该溶液可有效使用 3 天。

3.8 甲醛系列标准溶液：精密量取甲醛标准物质水溶液（3.1）适量，用磷酸溶液（3.6）稀释成 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准系列溶液。

4 仪器

4.1 高效液相色谱仪，具有二极管阵列检测器，配色谱工作站。

4.2 微量进样器或者自动进样装置。

4.3 分析天平。

4.4 离心机。

4.5 精密吸量管或精密移液器。

4.6 涡旋振荡器。

5 分析步骤

5.1 样品处理

取样品 0.2g，加入 10mL 磷酸溶液(3.6)，涡旋处理 1 分钟，离心，取上清液作为待测溶液。

注：样品溶液在当日完成测定。

5.2 色谱参考条件

色谱柱：C18 色谱柱（250 ×4.6 mm，5 μm）；

流动相：磷酸溶液（3.6）

流速：1.0 mL/min；

柱温：20 ℃；

检测波长：420 nm；

进样体积：10 μL；

柱后衍生溶液流速：0.5 mL/min；；

衍生温度：100 ℃。

5.3 测定

在“5.2”项色谱条件下，取“3.8”项下的甲醛系列标准溶液分别进样，进行液相色谱分析，以系列标准溶液浓度为横坐标，甲醛衍生物的峰面积为纵坐标，进行线性回归，建立标准曲线，得到回归方程。取“5.1”项下处理得到的待测溶液进样 10 μL，根据测定的甲醛衍生物的峰面积，代入标准曲线计算游离甲醛的质量浓度。按“6”计算样品中游离甲醛的含量。

6 分析结果的表述

6.1 计算

$$\omega(\text{游离甲醛}) = \frac{\rho \times V}{m \times 10^6} \times 100$$

式中： ω （游离甲醛）——化妆品中游离甲醛的含量，%；

m ——样品取样量，g；

ρ ——代入标准曲线计算得到的样品中甲醛的质量浓度， $\mu\text{g/mL}$ ；

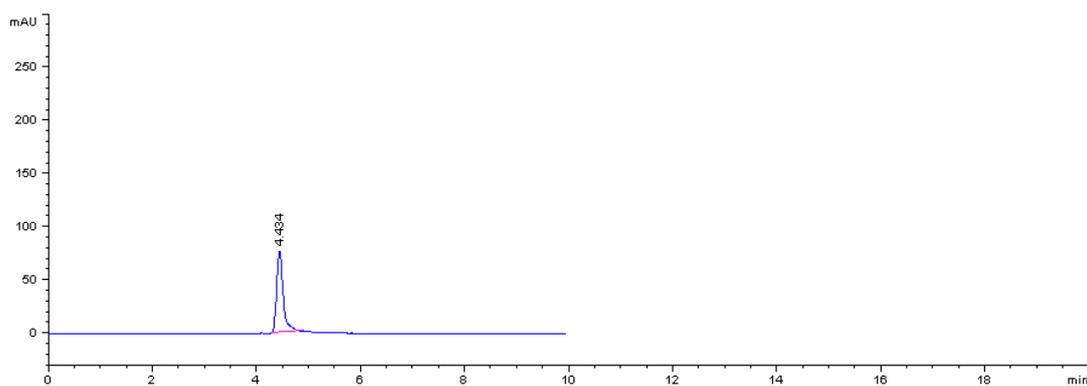
V ——定容体积，mL。

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

6.2 回收率和精密度

回收率为 95.3% - 112.5%，相对标准偏差小于 10%。

7 色谱图



甲醛标准溶液的高效液相色谱图

8 阳性结果确认

阳性样品需采用第一法“8.3”项下液相色谱-质谱法进行确证。

化妆品中甲醛检测方法修订说明

为进一步完善化妆品中禁限用物质检测方法的标准体系,加强化妆品中禁限用物质的监督管理,受中国食品药品检定研究院的委托,我所对化妆品中甲醛的检测方法进行了修订完善。现就有关情况说明如下:

1 甲醛基本信息

甲醛(Formaldehyde 分子式: CH_2O , MW:30.03),无色有刺激性的气体,沸点 -19.5°C 。蒸气压 10mmHg(-80°C)。易溶于水、醇和醚。

甲醛是原浆毒物,能与蛋白质结合,吸入高浓度甲醛后,会出现呼吸道的严重刺激和水肿、眼刺痛、头痛,也可发生支气管哮喘。皮肤直接接触甲醛,可引起皮炎、色斑、坏死。故《化妆品卫生规范》2007年版中规定喷雾产品的化妆品中不得检出甲醛,口腔卫生产品中含量 $\leq 0.1\%$,其它产品中甲醛含量 $\leq 0.2\%$ (以游离甲醛计)。指甲硬化剂中含量 $\leq 5\%$ 。同时规定甲醛释放剂的限量为0.1-0.6%,含甲醛或甲醛释放剂的化妆品中,当甲醛含量超过0.05%(以游离甲醛计)时,须在产品标签上标印“含甲醛”。

2 修订的必要性

目前甲醛的测定方法主要有:1)化妆品卫生规范(2007年版),该方法为紫外分光光度法,在过量铵盐存在下,甲醛与乙酰丙酮和氨作用生成黄色的3,5-二乙酰基-1,4-二氢卢剔啶。采用该方法进行检验时发现如下问题:(1)、易受样品基质以及试剂颜色因素影响,含硫化合物需另行去除干扰,但实际检验中较难把握。(2)、紫外分光光度法,单点测定,结果偏差较大,操作过程不容易控制。2)国食药监许【2011】96号文附件2,该方法为甲醛在酸性条件下与2,4-二硝基苯肼反应生成黄色的2,4-二硝基苯腙,柱前衍生化液相色谱测定。存在的主要问题为:配方中的其他甲醛释放体(双羟基咪唑烷基脲、乌洛托品等)在前处理过程中会额外释放甲醛,从而使得测定结果偏高。由于化妆品中卫生规范中甲醛的限量为以游离甲醛计,因此,现有方法无法有效满足监管的需求,需要进行修订。

3 修订依据及文献

- (1)《化妆品卫生规范》(2007年版)
- (2) 90/207/EEC
- (3) 化妆品中禁用物质和限用物质检测方法验证技术规范
- (4) 化妆品中甲醛的检测方法(国食药监许[2011]96号文附件2)

(5) 衍生-顶空气相色谱法测定化妆品中游离甲醛, 环境与职业医学, 2012,29(7), 459-461

(6) 释放甲醛类化妆品防腐剂的检测, 《第八届中国化妆品学术研究会论文集》

4 修订过程

受中检院委托, 我所对化妆品中的游离甲醛的检测方法进行了研究摸索。本方法修订时, 尽量采用目前化妆品实验室普遍具有的分析技术, 兼具方法的可行性, 保证检测方法的可操作性与重复性。实验中, 分别考察了液态水基类, 凝胶类, 膏霜乳液类以及气雾剂类等不同基质样品的前处理方法和分析方法, 并对甲醛释放体释放甲醛的条件进行了考察, 最终形成了柱前衍生-液相色谱法和柱后衍生-液相色谱法两种检测方法。

建立的方法分别经浙江省食品药品检验研究院, 辽宁省药品检验检测院, 广西壮族自治区食品药品检验所进行了验证复核。

5 需重点说明的问题

(1) 关于体例

本检测方法主要参照国家食品药品监督管理局已发布的化妆品中禁限用物质检测方法的体例, 便于化妆品检验领域相关检验人员的阅读和实际操作。

(2) 关于检测方法的建立和验证

我所及浙江省食品药品检验研究院, 辽宁省药品检验检测院, 广西壮族自治区食品药品检验所按照《化妆品中禁用物质和限用物质检测方法验证技术规范》(国食药监许[2010]455号文)的要求分别对修订后的方法进行了验证。

结果表明, 本方法在 0.005%~0.2% 范围内线性关系良好, 若取 0.2g 样品进行测定, 本方法检出浓度为 0.003%, 定量浓度为 0.005%。

(3) 柱前衍生与柱后衍生方法选择

柱前衍生-液相色谱法收载 2 种方法, 方法一采用酸性条件进行样品处理, 有效抑制咪唑烷基脲等(除乌洛托品外)甲醛释放体在前处理过程中额外释放甲醛。方法二采用乙腈进行前处理, 适用于配方中含有乌洛托品等遇酸分解甲醛的物质的样品中游离甲醛的测定。

柱后衍生液相色谱法系参照 90/207/EEC 修订而得。本方法采用酸性溶液进行样品提取, 不适用于含乌洛托品等酸性条件下易分解产生甲醛的样品中游离甲醛的测定以及液态气雾剂类样品中游离甲醛的测定。

(4) 阳性样品的确证

阳性样品均需采用液相色谱-质谱法进行确证。

对于配方中含有甲醛释放体(除乌洛托品外)的样品, 如果采用柱前衍生高效液相色谱

法检测结果为不合格，需要采用柱后衍生高效液相色谱法进行复核，且供试品溶液需当天完成测定。

化妆品中甲醛的检测方法编制说明

甲醛 (Formaldehyde 分子式: CH₂O ,MW:30.03), 无色有刺激性的气体, 沸点-19.5℃。蒸气压 10mmHg(-80℃)。易溶于水、醇和醚。

甲醛是原浆毒物, 能与蛋白质结合, 吸入高浓度甲醛后, 会出现呼吸道的严重刺激和水肿、眼刺痛、头痛, 也可发生支气管哮喘。皮肤直接接触甲醛, 可引起皮炎、色斑、坏死。故《化妆品卫生规范》2007 年版中规定喷雾产品的化妆品中不得检出甲醛, 口腔卫生产品中含量≤0.1%, 其它产品中甲醛含量≤0.2% (以游离甲醛计)。指甲硬化剂中含量≤5%。同时规定甲醛释放剂的限量为0.1-0.6%, 含甲醛或甲醛释放剂的化妆品中, 当甲醛含量超过0.05% (以游离甲醛计) 时, 须在产品标签上标印“含甲醛”。

(一)、现有标准及检验方法概述

一、化妆品卫生规范(2007 年版)

该方法为紫外分光光度法, 在过量铵盐存在下, 甲醛与乙酰丙酮和氨作用生成黄色的 3, 5-二乙酰基-1, 4-二氢卢剔啶。方法检出浓度为 18μg/g, 定量浓度为 60μg/g。

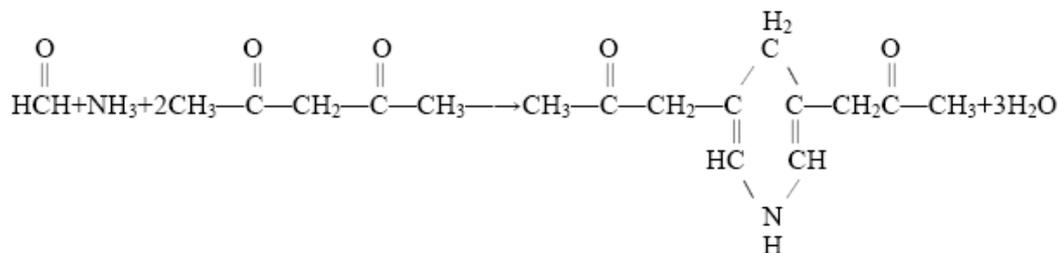


图 1 甲醛衍生化反应式

采用该方法进行检验时发现如下问题:

- (1)、易受样品基质以及试剂颜色因素影响, 尤其是加入珠光粉的样品, 过滤和离心较为困难。
- (2)、含硫化合物需另行去除干扰, 但实际检验中较难把握。
- (3)、紫外分光光度法, 单点测定, 结果偏差较大, 操作过程不容易控制。

二、国食药监许【2011】96 号文附件 2

该方法为柱前衍生液相色谱-紫外检测法，样品中的甲醛在酸性条件下与 2,4-二硝基苯肼反应生成黄色的 2, 4-二硝基苯腙，经高效液相色谱分离，紫外检测器在 355 nm 波长下检测，根据保留时间定性，峰面积定量，以标准曲线法计算含量。本方法对甲醛的检出限为 0.01 μg，定量下限为 0.052 μg。取 0.2 g 样品时，本方法对甲醛的检出浓度为 0.001%，最低定量浓度为 0.0052%。

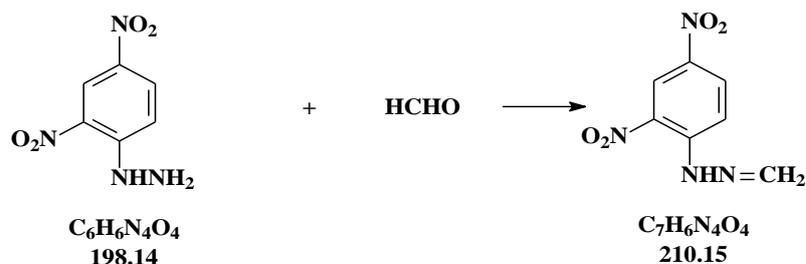


图 2 甲醛衍生化反应式

该方法存在如下问题：含乌洛托品以及其他含有甲醛释放体类防腐剂的化妆品在样品前处理过程中会释放额外的甲醛，从而使得测定结果偏高。

三、欧盟方法（90/207/EEC）

该方法为柱后衍生-高效液相色谱法。供试品经盐酸和氯仿提取后，经色谱分离，游离甲醛与乙酰丙酮衍生后于 420nm 波长下测定。本法前处理过程中采用的盐酸及氯仿为易制毒试剂，不适合作为常规提取溶剂，而方法中又要求供试液需在 1 小时内进样完毕，不适合实验室的批量操作。此外，由于甲醛在 C18 柱上保留较弱，对于复杂基质样品会产生分离不完全的情况。

四、文献方法

4.1 化妆品中甲醛的测定

目前化妆品中甲醛的测定方法主要有分光光度法，比色法，柱前衍生-色谱法。文献报道检验方法大致分为两类，一类为样品经提取，衍生后采用高效液相色谱法进行测定。主要大都采用 2,4-二硝基苯肼的柱前衍生方法，对衍生条件（配制溶剂，PH，时间，温度）等各有不同。但可以通过对衍生条件以及提取溶剂和萃取溶剂的调整来阻断甲醛释放剂的干扰。另一类为直接测定法（顶空气相色谱或气相色谱-质谱法），前处理较为简单，不足之处在于甲醛分子量过低，色谱峰形以及灵敏度受影响较大。

4.2 食品中甲醛的测定

涉及方法较广，有水蒸气蒸馏，滴定法，液相色谱法，气相色谱法，气相色谱质谱法等方法。衍生法采用 2,4-二硝基苯肼直接和甲醛衍生，气相色谱或液相色谱测定衍生物。酒中微量甲醛的测定采用 Hantzsch 反应（PH5.5 体系下，和乙酰丙酮、氨反应），液相色谱-荧光检测器测定。

（二）、化妆品中甲醛检测方法的完善研究——柱前衍生-高效液相色谱法

一、原方法干扰试验

化妆品中常用的甲醛释放体有 2-溴-2-硝基丙烷-1,3-二醇（0.1%）、5-溴-5-硝基-1,3-二噁烷（0.1%）、甲醛苯醇半缩醛（0.15%）、双（羟甲基）咪唑烷基脲（0.5%）、DMDM 乙内酰脲（1, 3-二羟甲基-5,5-二甲基海因，0.6%）、咪唑烷基脲（0.6%）、乌洛托品（0.15%）、聚季铵盐-15（0.2%）、羟甲基甘氨酸钠（0.5%）等。该方法的缺陷在于供试品的提取过程中将乌洛托品一并提取出来，乌洛托品在酸性条件下迅速分解成甲醛，并与 2、4-二硝基苯肼反应，从而使得测定结果偏高。而且随着前处理时间的增加，干扰变大。为了考察本方法对于其他甲醛释放体是否存在同样的问题，进行了如下实验：

称取空白基质样品 0.2g，一式 6 份，分别加入下表中的甲醛释放体约 1mg，按照国食药监许[2011]96 号文的方法依法操作，结果（见下表）表明，本方法对于配方中含有甲醛释放体类防腐剂的样品会在提取过程中产生额外的甲醛。产生额外的甲醛的途径可能有两个：1) 提取溶剂加速了甲醛释放体释放甲醛的速度，2) 衍生过程破坏了甲醛释放体与甲醛的平衡，加速甲醛释放。

表 1 国食药监许[2011]96 号文附件方法甲醛释放体实验结果

甲醛释放体	产生的甲醛含量（%）
咪唑烷基脲	0.02
双(羟基)咪唑烷基脲	0.035
乌洛托品	0.05
乙内酰脲	0
2-溴-2-硝基丙烷-1,3-二醇	0.01
5-溴-5-硝基-1,3-二噁烷	0

二、实验研究过程

化妆品中游离甲醛的测定主要难点有以下两个方面：（1）甲醛分子量小，挥发性强，若不经衍生，如何找到合适的分析条件，提高分离效果，排除与其他成分的干扰。可以选择柱后衍生-高效液相色谱法进行测定，详见第（四）部分。

（2）衍生可以提高响应灵敏度，但如何避免提取过程中甲醛释放体产生甲醛是提取过程需要解决的技术难题。进行了如下的试验研究：

1、采用 2,4-二硝基苯肼进行柱前衍生-高效液相色谱法测定

1.1 衍生溶剂的考察

样品经乙腈水溶液提取，分别采用乙腈水溶液（1:1）、不同 PH 缓冲液配制衍生溶液进行试验，结果发现甲醛标准品形成的衍生物的色谱峰面积不随衍生溶液配制溶液的不同发生变化，而乙腈水溶液（1:1）配制的衍生溶液则可以有效减少乌洛托品释放甲醛。

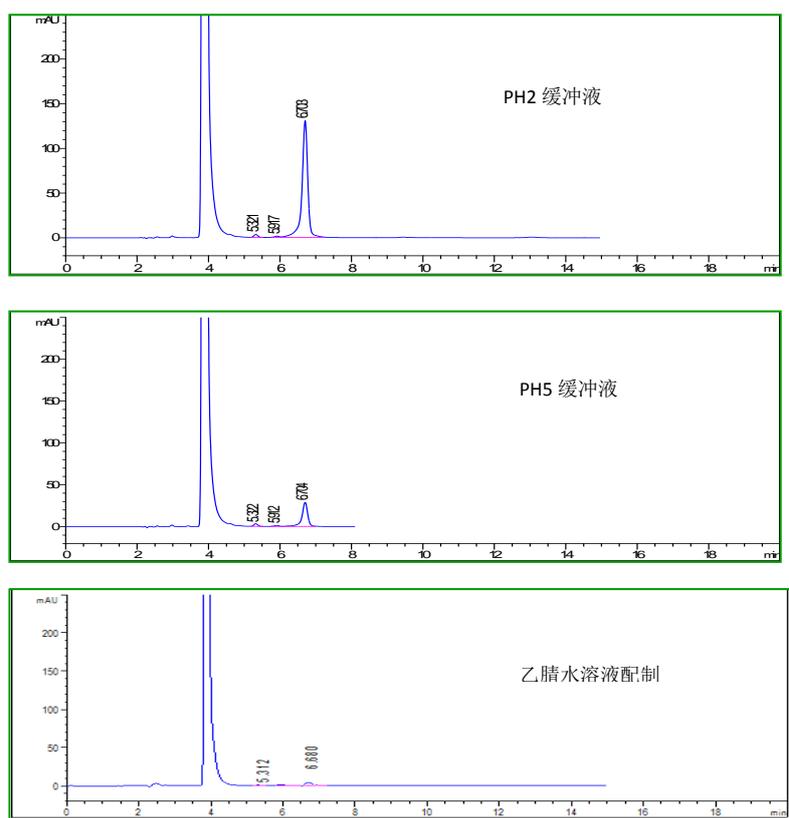


图 3 不同衍生溶液的色谱图

1.2 衍生溶剂和时间

乌洛托品在酸性条件下会迅速释放甲醛，采用不同比例的乙腈溶液配制硝基苯肼衍生溶液。分别取甲醛标准品和乌洛托品，加入 20mL 衍生溶液进行衍生试验，结果表明，当乙腈

浓度大于 50%时，乌洛托品释放甲醛的速度明显减慢，干扰变小，但当乙腈浓度大于 80%时，甲醛与 2, 4-二硝基苯肼的反应变得缓慢，需要进一步提高温度，延长反应时间。即当采用 80%乙腈配制衍生溶液，40℃超声处理 1 小时，乌洛托品的干扰最小。一旦衍生溶液中含有酸，干扰会迅速增大。



图 4 不同比例乙腈溶液衍生结果

1.3 其他甲醛释放体实验结果

采用此方法对甲醛释放体进行试验，称取 1mg 的甲醛释放体（相当于 0.5%），结果表明（以 0.2g 样品，定容溶剂为 10mL 计），乌洛托品的干扰较小（相当于样品中含 0.005%），咪唑烷基脲和双羟甲基咪唑烷基脲的干扰较大（相当于样品中含 0.03%和 0.05%的甲醛），究其原因，可能是由于影响咪唑烷基脲和双羟甲基咪唑烷基脲释放甲醛的因素与乌洛托品不同，其甲醛释放速度随衍生溶液的 PH 值，衍生温度和时间的增加，两者的干扰随之增加。为此，进一步选用反应速度较快，衍生温度较低的五氟苯肼进行试验。

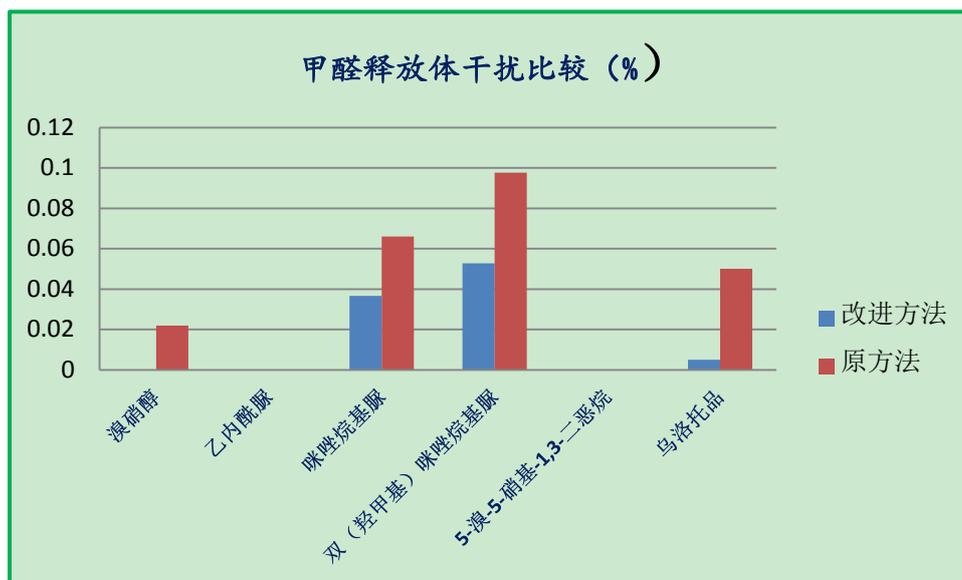


图5 甲醛释放体实验结果

2、五氟苯胍衍生反应

2.1 衍生条件

取 10 μ g/mL 的甲醛标准品溶液（乙腈配制）1mL，分别加入 2mL 五氟苯胍衍生溶液，对下述条件进行摸索。

不同衍生液浓度（0.5 g/L、1 g/L、1.5 g/L、2g/L）实验结果表明，0.5 g/L 即可反应完全。

不同衍生液溶剂（水，50%乙腈，乙腈，0.2%磷酸，50%乙腈（含 0.2%磷酸），乙腈（含 0.2%磷酸））实验结果表明，除乙腈和乙腈（含 0.2%磷酸）外，不同衍生溶剂差异不大。其中又以水溶液下反应速度最快。50%乙腈配制溶液衍生相对较慢，但 30 分钟均可基本反应完全。

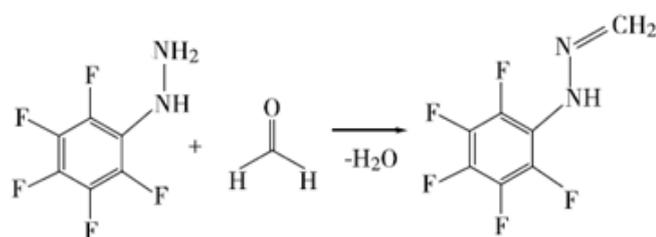


图6 甲醛衍生反应式

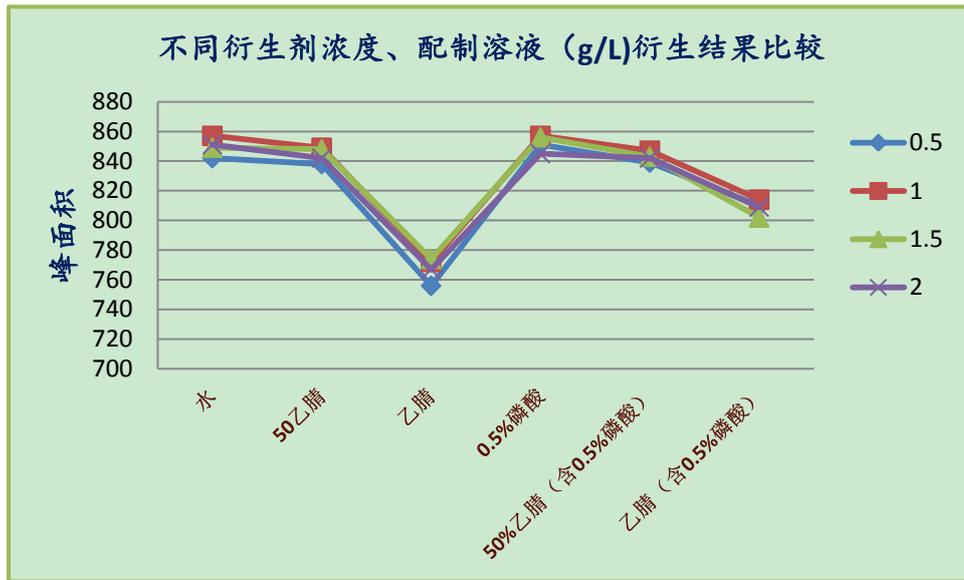


图7 不同衍生剂浓度剂配制溶液衍生结果比较

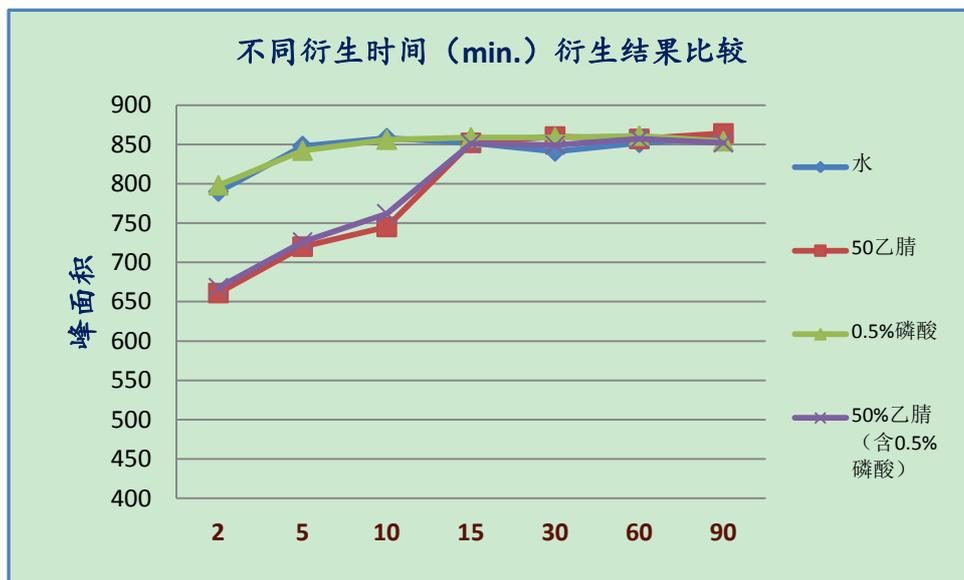


图8 不同衍生时间比较

2.2 甲醛释放体释放甲醛的条件考察

乌洛托品在酸性条件下快速释放甲醛，咪唑烷基脲和双羟甲基咪唑烷基脲在溶液中会缓慢释放甲醛。乌洛托品在乙腈和水中均有较好的溶解度，在水中释放甲醛速度较快，咪唑烷基脲和双羟甲基咪唑烷基脲溶解于水，微溶于乙腈。综上，称取乌洛托品 0.3mg，咪唑烷基脲 1.2mg，双羟甲基咪唑烷基脲 1mg，分别溶解于 10mL 水，50%乙腈和乙腈中。分别与 1g/L 的五氟苯胍水溶液，50%乙腈溶液进行衍生。结果见下表。

表2 不同条件下甲醛释放体释放甲醛的考察

甲醛释放体	提取溶剂	五氟苯胍			
		水溶液	50%乙腈溶液	0.2%磷酸溶液	50%乙腈溶液 (含0.2%磷酸)

咪唑烷基脲	水	175	193	104	130
	0.2%磷酸	150	162	69	143
	50%乙腈	152	171	89	103
	乙腈	88	89	66	85
双羟甲基咪唑 烷基脲	水	350	328	200	250
	0.2%磷酸	221	189	110	200
	50%乙腈	223	206	160	180
	乙腈	134	128	105	113
乌洛托品	水	308	240	4521	1023
	50%乙腈	280	150	3852	958
	乙腈	268	53	3454	892

综上所述，乌洛托品在酸性水溶液中释放甲醛速度较快，在乙腈溶液中释放缓慢，因此，前处理过程中要避免加入酸，尽可能降低水的浓度。以乙腈提取，50%乙腈溶液配制衍生液为宜。而咪唑烷基脲和双羟基咪唑烷基脲在溶液状态下会释放甲醛，加酸可以有效抑制其释放甲醛的量。

2.3 基质样品中甲醛释放体的影响考察

称取空白基质样品(分别采用原方法及五氟苯胍衍生的方法检验，均未检出甲醛)0.2g，再称取配方量的甲醛释放体(乌洛托品 0.3mg,咪唑烷基脲 1.2mg,双羟基咪唑烷基脲 1mg)，按下述方法进行试验。

咪唑烷基脲和双羟基咪唑烷基脲干扰试验：

前处理方法一：取样品 0.2g，分别加入咪唑烷基脲，双羟基咪唑烷基脲 1mg，加入 10mL 乙腈涡旋处理 1 分钟，离心，取上清液 1mL 加 2mL 衍生溶剂(1g/L 的磷酸溶液)涡旋 1min，离心，取上清液，即得。

前处理方法二：将衍生溶剂改为 50%乙腈的磷酸溶液，余同方法一。

前处理方法三：取样品 0.2g，分别加入咪唑烷基脲，双羟基咪唑烷基脲 1mg，加入 10mL 的衍生溶液(1g/L 磷酸溶液)涡旋处理 1 分钟，离心，取上清液，即得。

乌洛托品干扰试验：取样品 0.2g，加入乌洛托品 1mg，加入 10mL 乙腈涡旋处理 1 分钟，离心，取上清液 1mL 加 2mL 衍生溶剂(1g/L 的 50%乙腈溶液)涡旋 1min，静置 30 分钟，离心，取上清液，即得。

表 3 干扰试验测定结果（相当于样品中甲醛的含量 $\mu\text{g/g}$ ）

甲醛释放体	基质类型	乙腈提取，五氟苯胂衍生			五氟苯胂 0.2%磷酸 溶液直接 衍生	原方法（2,4- 二硝基苯胂）	
		50%乙腈溶液	0.2%磷 酸溶液	50%乙腈溶液 （含 0.2%磷 酸）			
咪唑烷基脲	水	/	79	108	90	279	
	霜		81	117	75	391	
	乳		82	115	60	446	
双羟甲基咪 唑烷基脲	水		202	341	100	514	
	霜		212	345	90	486	
	乳		219	349	60	661	
乌洛托品	水		32	/	/	/	529
	霜		46				540
	乳		49				664
	喷雾	14	521				

结果：乌洛托品须用 50% 乙腈配制衍生溶液进行衍生。

咪唑烷基脲和双羟基咪唑烷基脲，用 0.2% 磷酸溶液配制衍生溶液可有效降低干扰。

2.4 稳定性考察

取上述干扰试验样品溶液，进行稳定性考察。结果表明，咪唑烷基脲和双羟基咪唑烷基脲的干扰样品溶液随着时间会缓慢变大，因此，需要进一步考察阻断反应的条件。

表 4 稳定性考察结果（相当于样品中甲醛的含量 $\mu\text{g/g}$ ）

甲醛释放体	基质类型	0H	2H	4H	8H
双羟基咪唑烷基脲	水	100	110	120	135
	乳	65	71	80	88
	霜	90	95	105	113
咪唑烷基脲	水	90	93	99	108
	乳	75	78	84	90
	霜	60	62	69	75
乌洛托品	水	15	26	32	53
	乳	21	38	46	66
	霜	26	37	49	69

2.5 阻断条件的考察：

咪唑烷基脲和双羟基咪唑烷基脲干扰试验：

取样品 0.2g，加入甲醛 100 μg ，加入 10mL 的衍生溶液（1g/L 的 0.2%磷酸溶液）涡旋处理 1 分钟，离心，取上清液 1mL，分别用二氯甲烷 2mL 萃取 1 次，2 次，3 次。结果表明萃取 1 次，即可将 95% 以上的衍生产物转移至二氯甲烷。

溶剂效应的考察：由于阻断溶剂采用二氯甲烷，采用反相色谱可能会产生溶剂效应，因此，对色谱柱进行了考察，结果表明，不同品牌的色谱柱所产生的溶剂效应各不相同，为了减少溶剂效应，将二氯甲烷提取后的溶剂采用甲醇稀释定容至 5mL，结果表明，溶剂效应基本消除，供试品溶液中甲醛衍生物的色谱峰不随时间增长发生变化。

乌洛托品干扰试验：取样品 0.2g，加入乌洛托品 1mg，加入 10mL 乙腈涡旋处理 1 分钟，离心，取上清液 1mL 加 2mL 衍生溶剂（1g/L 的 50%乙腈溶液）涡旋 1min，静置 30 分钟，加入 3mL 二氯甲烷，涡旋 1min，离心，弃去上层溶液，下层溶液用二氯甲烷定容至 5mL，即得。由于将甲醛衍生物转移至有机相中，因此，其峰面积不再随放置时间增长而变大。

2.6 供试品溶液制备方法的确立

综上，确定供试品溶液制备方法如下：

（1）适用于配方中不含乌洛托品等遇酸分解产生甲醛的物质的样品以及液态气雾剂类样品

取样品 0.2g，加入 10mL 衍生溶液 A(3.9)，涡旋处理 1 分钟，离心，取上清液 1mL，加入 2mL 二氯甲烷，涡旋处理 1min，弃去上层溶液，下层液用甲醇定容至 5mL，作为待测溶液。

注：配方中不含咪唑烷基脲和双羟基咪唑烷基脲的样品可以直接取上清液作为待测溶液。

（2）适用于配方中含乌洛托品等遇酸分解甲醛的物质的样品以及液态气雾剂类样品

取样品 0.2g，加入 10mL 乙腈，涡旋处理 1 分钟，离心，取上清液 1mL，加 2mL 衍生溶液 B（3.10），涡旋处理 1min，静置 30 分钟，加入 3mL 二氯甲烷，涡旋 1min，离心，弃去上层溶液，取下层溶液作为待测溶液。

2.7 方法适用范围

化妆品中的甲醛大都由配方中的甲醛释放体引入，而常见的甲醛释放体主要添加于沐浴乳，洗面奶，面霜等清洁类产品和护肤类产品中，除臭类产品中也可能含有适量的甲醛，这些产品包含了液态水基类，膏霜乳液类，凝胶类以及液态气雾剂类等剂型，因此，本方法的适用范围主要为上述 4 类化妆品。

（三）、 高效液相色谱-柱前衍生方法学验证

一、实验室内验证

分别选取液态水基类（百雀灵清痘调理爽肤水），膏霜乳液类（隆力奇宝宝润肤霜），凝胶类（芦荟凝胶）以及液态气雾剂类（沁蓝风尚香体喷雾）样品进行方法学验证。

甲醛标准品 (AccuStandard, 213021105-01, 100.2 μ g/mL), 五氟苯肼, 磷酸等均为分析纯, 甲醇、乙腈均为色谱纯。

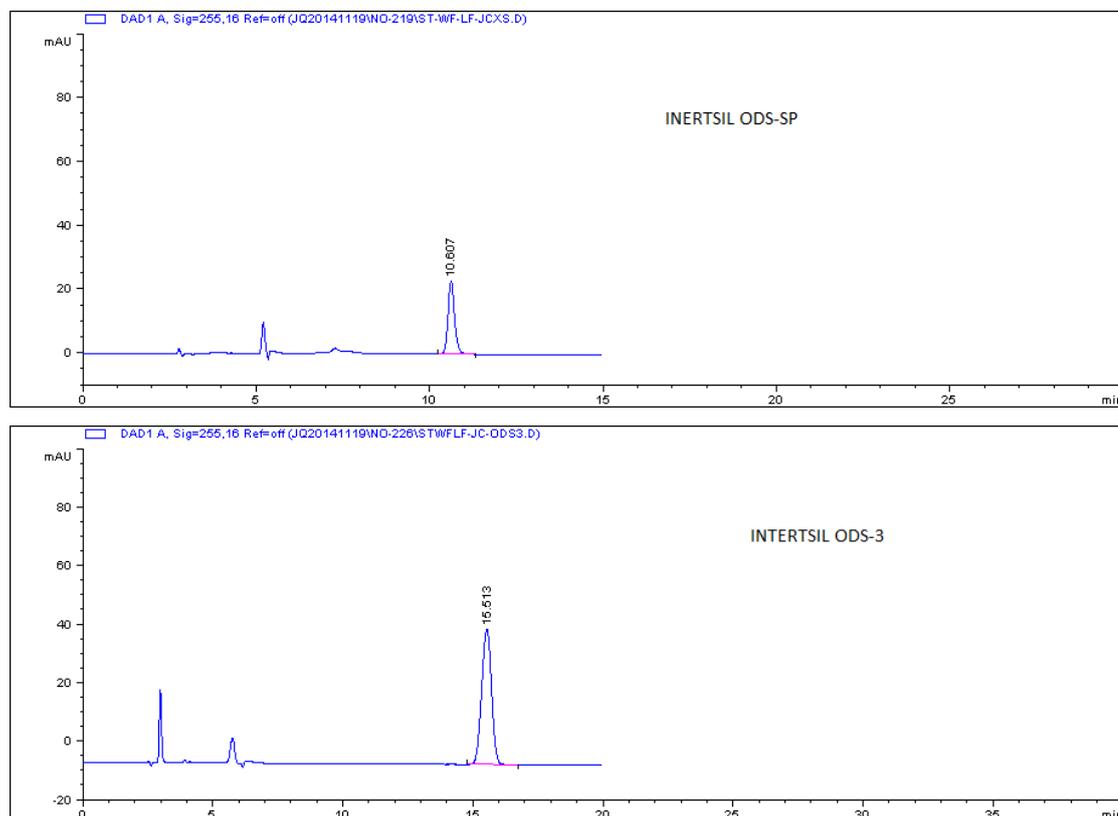
1、色谱系统适用性试验:

1) 不同色谱柱比较: 比较了 INERTSIL ODS-SP (250*4.6mm, 5 μ m), INERTSIL ODS-3 (250*4.6mm, 5 μ m), ZORBAX SB-Phenyl (250*4.6mm, 5 μ m)。结果不同色谱柱均可以获得良好的色谱峰, 且与其他干扰色谱峰分离良好。

2)、不同流动相: 比较了甲醇-0.5%磷酸, 甲醇-0.5%乙酸, 乙腈-0.5%乙酸, 结果表明, 不同流动相色谱峰形均较为对称, 考虑价格以及毒性因素, 选用甲醇-0.5%磷酸作为流动相。

3)、柱温比较: 不同柱温没有显著差异, 实验中选用 40 $^{\circ}$ C, 色谱峰保留时间在 10min 左右。

4) 检测波长: 选取最大吸收波长 255nm 作为测定波长。



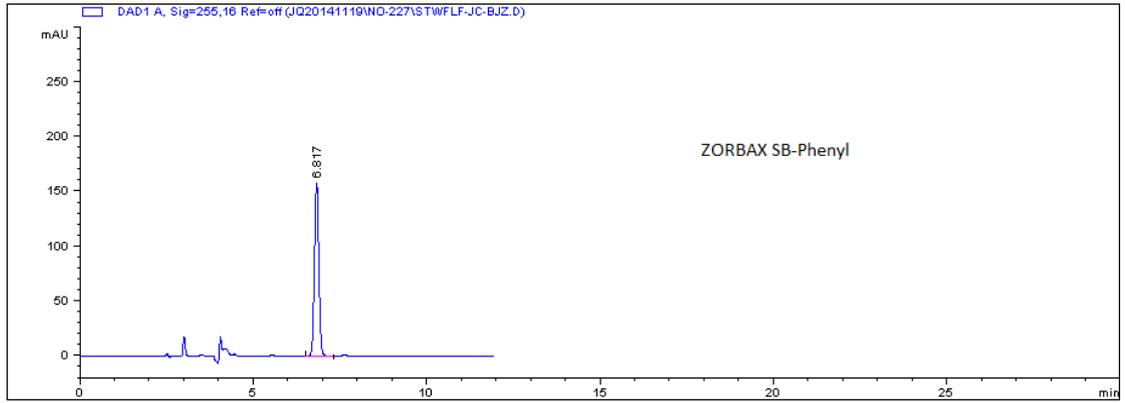


图 9 不同色谱柱甲醛衍生物的色谱峰

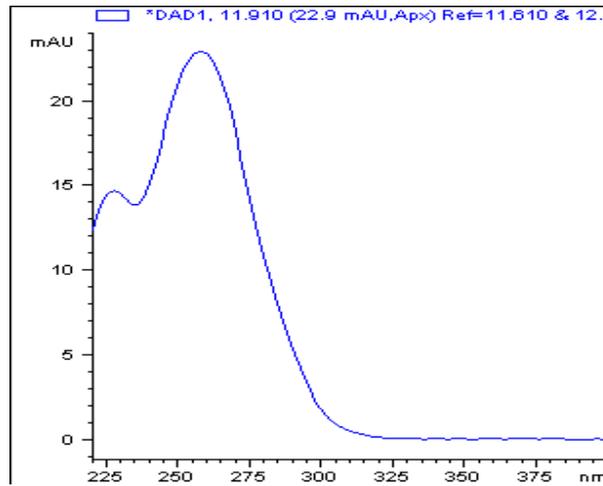
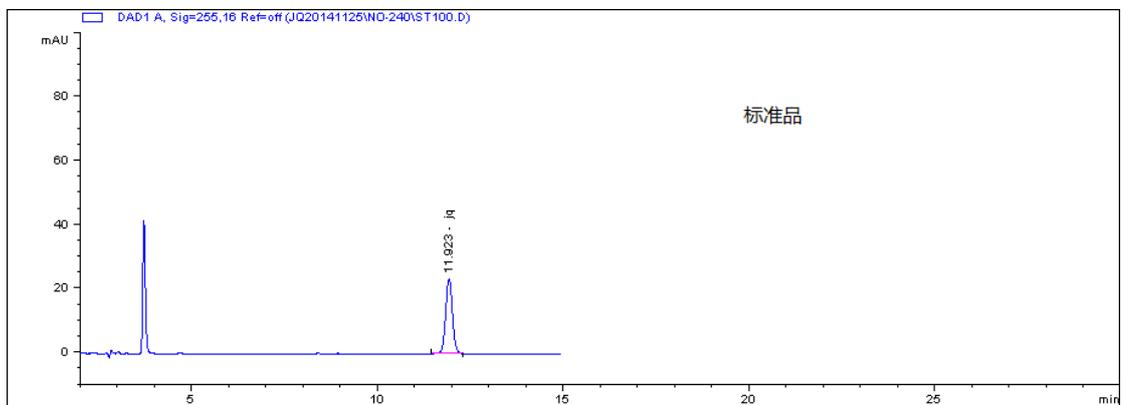
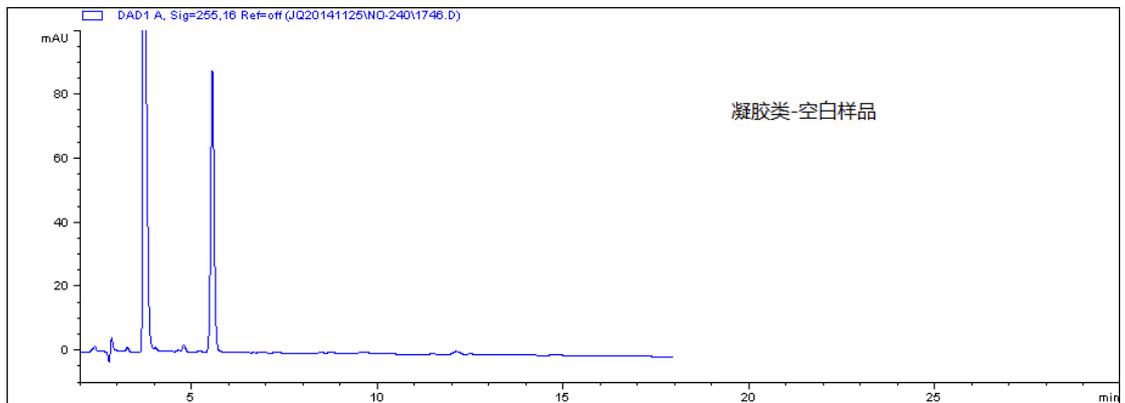
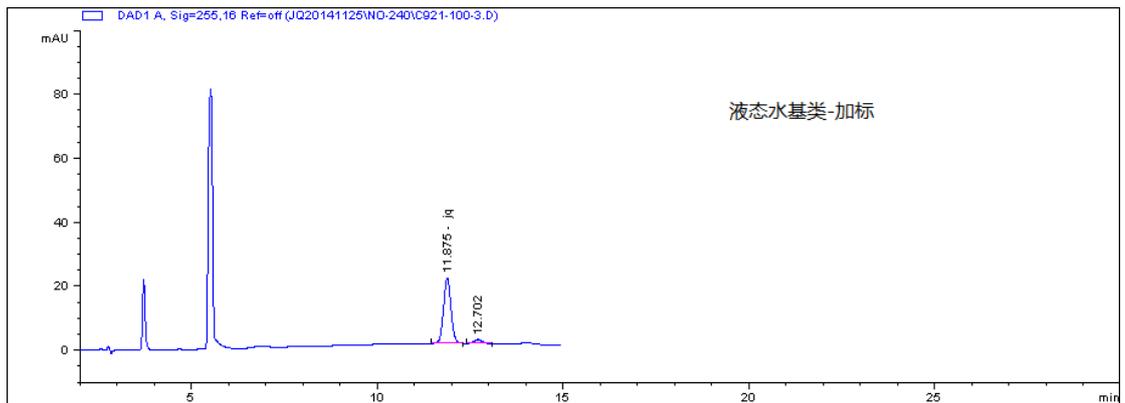
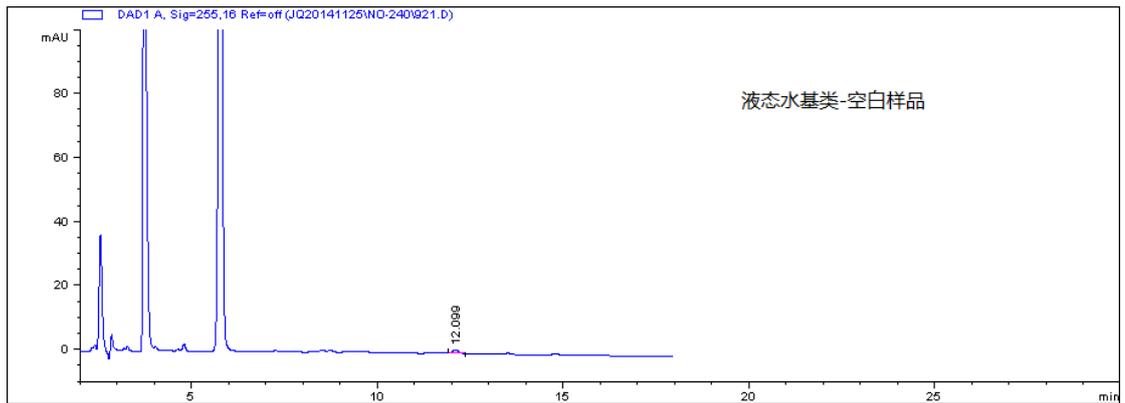
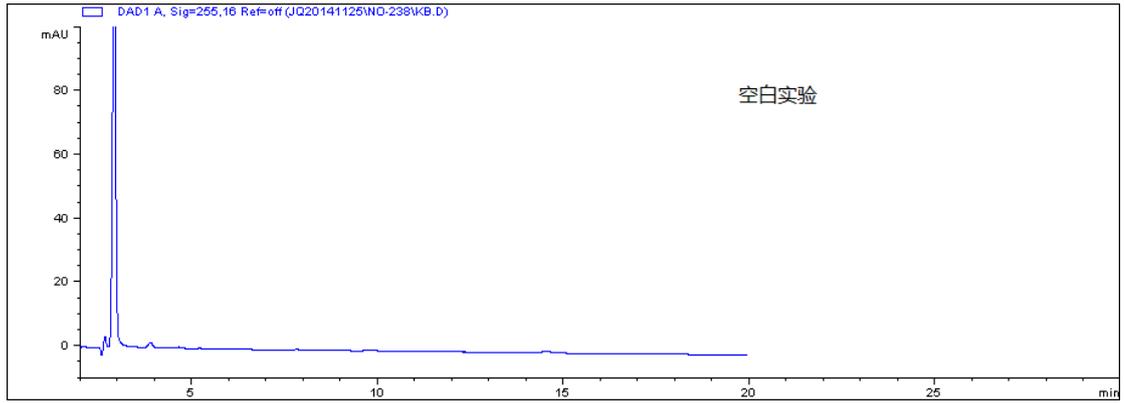
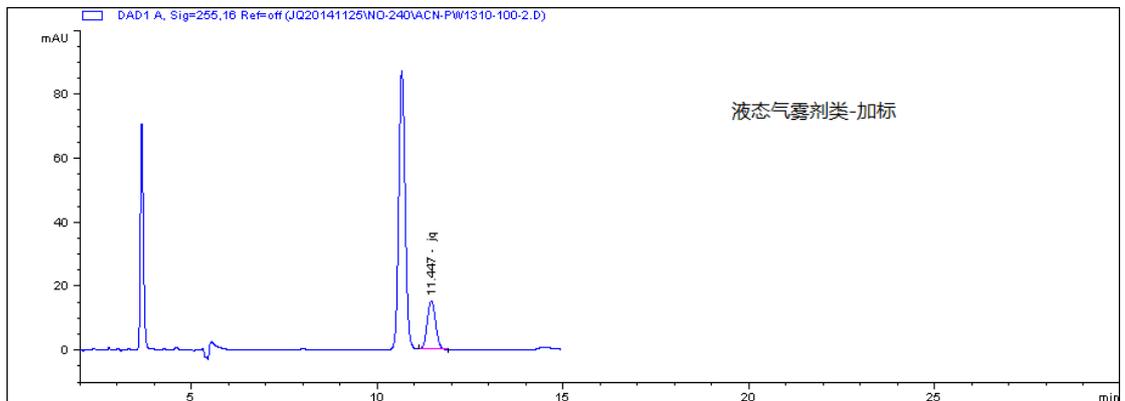
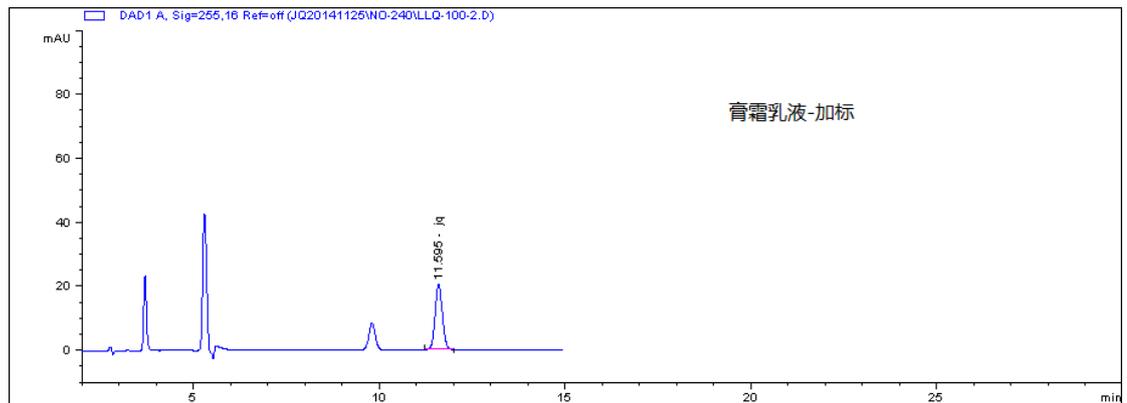
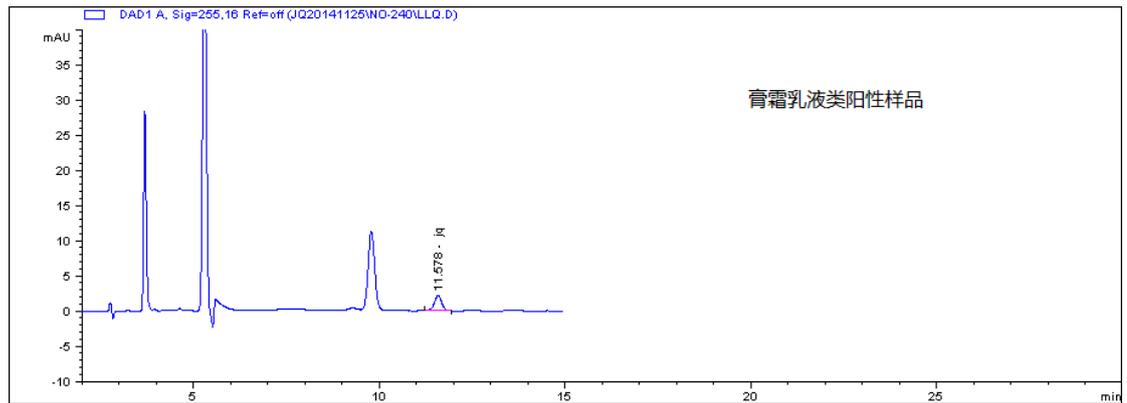
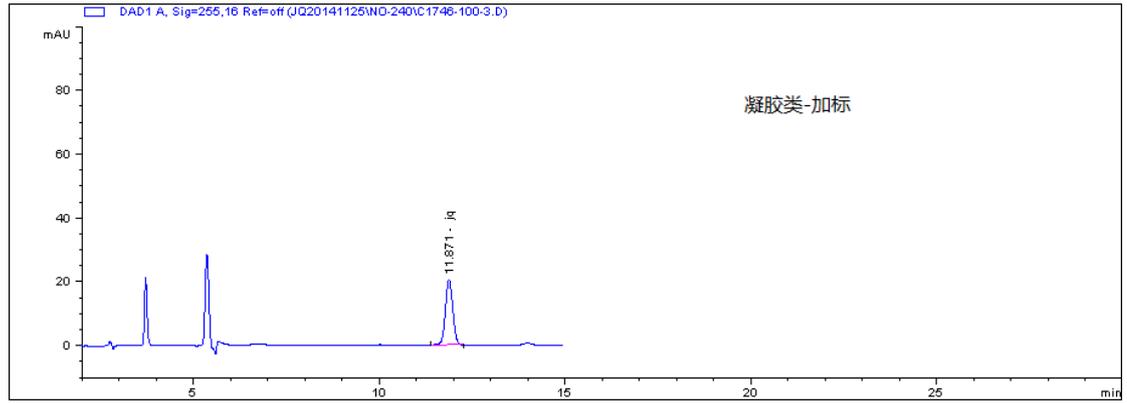


图 10 甲醛和五氟苯肼衍生物的 DAD 图

4) 特异性: 采用上述条件进行测定, 结果空白基质无干扰。







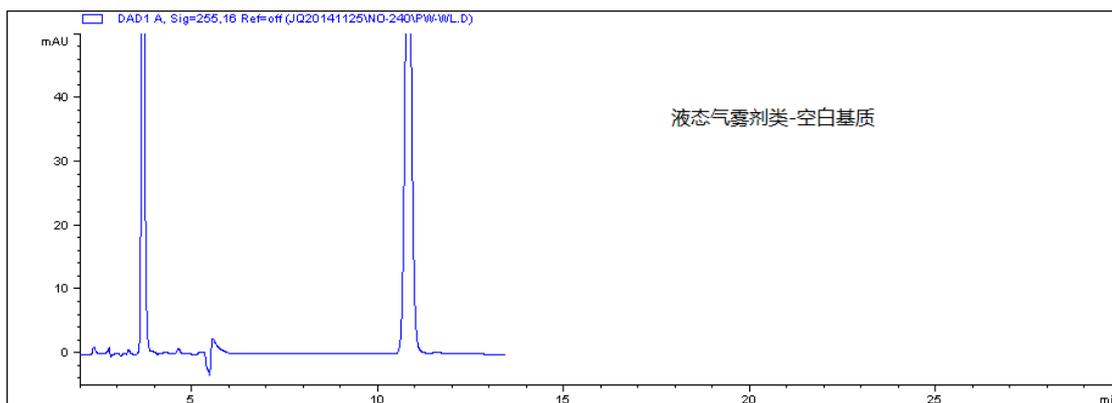


图 11 标准品、空白实验、基质样品、加标样品色谱图

2、线性

方法一标准曲线:取甲醛标准储备液,用 0.2%磷酸稀释成 10 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 、400 $\mu\text{g/mL}$ 的标准系列溶液。

精密吸取标准系列溶液各 1mL,加入衍生溶液 A 至 10mL,按照供试品溶液依法制备,即得质量浓度为 50、100、250、500、1000、2000 $\mu\text{g/g}$ 的系列浓度标准溶液。以标准溶液浓度为横坐标,甲醛衍生物峰面积为纵坐标绘制标准曲线,结果表明,当甲醛含量在 50 $\mu\text{g/g}$ ~2000 $\mu\text{g/g}$ 范围内,线性关系良好。

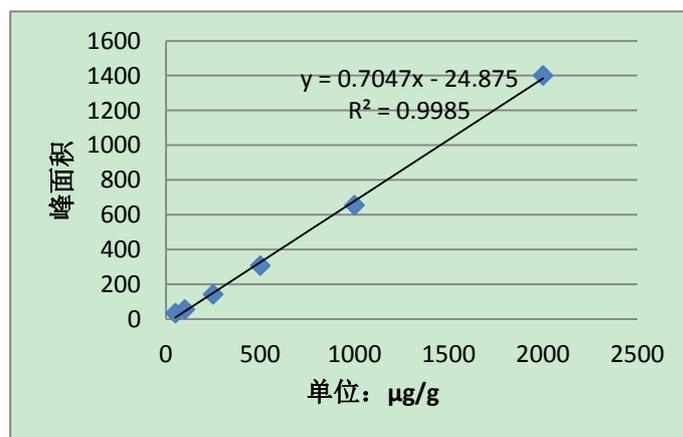


图 12 方法一溶液标准曲线线性关系图

方法一基质标准曲线:取液态水基类、液态气雾剂类、凝胶类和膏霜乳液类空白基质各 0.2g,精密加入标准系列溶液各 1mL,加入衍生溶液 A 至 10mL,按照供试品溶液依法制备,即得质量浓度为 50、100、250、500、1000、2000 $\mu\text{g/g}$ 的系列浓度标准溶液。结果基质标准曲线与溶液标准曲线无明显差异。

方法二标准曲线:取甲醛标准储备液,用乙腈稀释成 10 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 、400 $\mu\text{g/mL}$ 的标准系列溶液。

精密吸取标准系列溶液各 1mL，加入乙腈至 10mL，涡旋处理 1 分钟，离心，取上清液 1mL 加 2mL 衍生溶剂 B 涡旋 1min，静置 30 分钟，加入 3mL 二氯甲烷，涡旋 1min，离心，弃去上层溶液，下层溶液用二氯甲烷定容至 5mL，即得质量浓度为 50、100、250、500、1000、2000 $\mu\text{g/g}$ 的系列浓度标准溶液。结果表明，当甲醛含量在 50 $\mu\text{g/g}$ ~2000 $\mu\text{g/g}$ 范围内，线性关系良好。

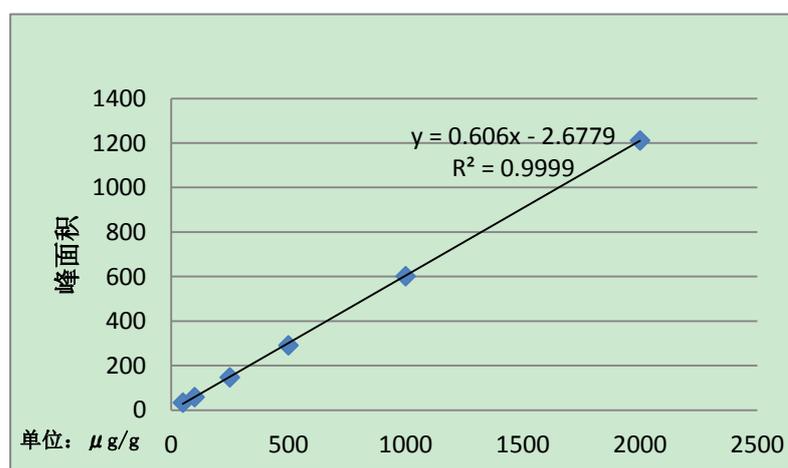


图 13 方法二溶液标准曲线线性关系图

3、重复性试验

方法一重复性试验：取液态水基类，凝胶类以及膏霜乳液类样品各 0.2g，一式六份，分别精密加入甲醛标准品 100 μg ，按供试品溶液依法制备，测定加入量，结果（见下表）表明，重复性试验结果良好，RSD 均小于 5%。

表 5 方法一重复性实验结果（单位： μg ）

编号	凝胶类	液态水基类	膏霜乳液类
1	91.37838	92.33403	96.51365
2	94.58388	92.44885	93.77484
3	88.74861	88.66599	99.54286
4	90.53144	90.55257	90.88397
5	85.41192	88.24322	92.62191
6	90.08918	90.60612	90.39125
平均	90.12390	90.47513	93.95475
RSD (%)	3.36	1.95	3.74

方法二重复性试验：取液态水基类，凝胶类，液态气雾剂类以及膏霜乳液类样品各 0.2g，一式六份，分别精密加入甲醛标准品 100 μg ，按供试品溶液依法制备，测定加入量，结果（见下表）表明，重复性试验结果良好，RSD 均小于 5%。

表 6 方法二重复性实验结果 (单位: μg)

编号	凝胶类	液态水基类	膏霜乳液类	气雾剂类
1	105.38522	87.36351	106.15026	85.13427
2	106.83916	85.27548	108.42	86.74693
3	110.95208	86.16496	108.369	85.51242
4	105.3268	89.0362	99.4538	91.2358
5	104.23628	88.2357	99.54286	89.32647
6	109.2357	90.1358	112.16382	88.32476
平均	107.54779	87.70194	105.68329	87.71344
RSD (%)	2.30	2.06	4.89	2.69

4、精密度试验

4.1 日内精密度试验

取 $10\mu\text{g/mL}$ 、 $400\mu\text{g/mL}$ 标准溶液各 1mL ，分别按照方法一和方法二的供试品溶液方法依法处理，得质量浓度为 $50\mu\text{g/g}$ 、 $2000\mu\text{g/g}$ 的标准溶液，分别作为低浓度精密度试验用供试品溶液和高浓度精密度试验用供试品溶液。连续进样 6 次，测定峰面积，结果表明精密度试验结果良好。

表 7 日内精密度试验结果

编号	方法一		方法二	
	低浓度 ($50\mu\text{g/g}$)	高浓度 ($2000\mu\text{g/g}$)	低浓度 ($50\mu\text{g/g}$)	高浓度 ($2000\mu\text{g/g}$)
1	44.73804	1401.29602	34.78614	1186.38
2	41.56141	1389.21369	34.33294	1191.19
3	43.7767	1403.2539	33.2954	1179.25
4	42.16243	1456.02387	34.52369	1154.42
5	41.37031	1423.155	34.2688	1189.24
6	42.66062	1456.688	35.15851	1191.79
平均	42.711585	1421.60508	34.39424667	1182.045
RSD (%)	3.08	2.04	1.83	1.21

4.2 日间精密度试验

取 $10\mu\text{g/mL}$ 、 $400\mu\text{g/mL}$ 标准溶液各 1mL ，分别按照供试品溶液制备方法依法制得质量浓度为 $50\mu\text{g/g}$ 、 $2000\mu\text{g/g}$ 的标准溶液，作为低浓度精密度试验用供试品溶液和高浓度精密度试验用供试品溶液。每天测定一次，连续测定 3 天，记录峰面积，结果表明日间精密度试验结果良好。

表 8 日间精密度试验结果

编号	方法一		方法二	
	低浓度 (50 $\mu\text{g/g}$)	高浓度 (2000 $\mu\text{g/g}$)	低浓度 (50 $\mu\text{g/g}$)	高浓度 (2000 $\mu\text{g/g}$)
第一天	44.73804	1401.29602	34.78614	1186.38
第二天	44.64304	1405.2597	34.6982	1189.3254
第三天	44.78614	1408.35125	35.23181	1186.25414
平均	44.72240667	1404.96899	34.90538333	1187.319847
RSD (%)	0.16	0.25	0.82	0.15

5、稳定性试验

5.1 日内稳定性试验

方法一：取液态水基类，凝胶类以及膏霜乳液类样品各 0.2g，各一式两份，精密加入甲醛标准品 20 μg 、400 μg ，按供试品溶液依法制备，作为低浓度稳定性试验供试品溶液和高浓度稳定性试验供试品溶液，测定加入量，结果（见下表）表明，稳定性试验结果良好，RSD 均小于 5%。

表 9 方法一日内稳定性试验结果（单位： μg ）

时间	凝胶类		液态水基类		膏霜乳液类	
	低浓度 (20 μg)	高浓度 (400 μg)	低浓度 (20 μg)	高浓度 (400 μg)	低浓度 (20 μg)	高浓度 (400 μg)
0 小时	18.818	356.43169	18.97798	341.60925	17.48246	321.5082
6 小时	20.41624	365.54252	19.62428	347.68109	19.13636	323.29324
13 小时	19.34352	368.1237	19.62327	375.3294	17.91489	330.72824
18 小时	19.89624	382.0124	19.8743	379.2364	19.39298	330.72824
25 小时	20.23579	385.7372	20.87012	376.43763	19.21018	332.51068
平均	19.741958	371.569502	19.79399	364.058754	18.627374	327.75372
RSD (%)	3.34	3.26	3.47	4.92	4.65	1.52

方法二：取液态水基类，凝胶类，液态气雾剂类以及膏霜乳液类样品各 0.2g，各一式两份，精密加入甲醛标准品 20 μg 、400 μg ，按供试品溶液依法制备，作为低浓度稳定性试验供试品溶液和高浓度稳定性试验供试品溶液，测定加入量，结果（见下表）表明，稳定性试验结果良好，RSD 均小于 5%。

表 10 方法二日内稳定性试验结果（单位： μg ）

时间	凝胶类		液态水基类		液态气雾剂类		膏霜乳液类	
	低浓度 (20 μg)	高浓度 (400 μg)						
0 小时	21.14471	411.23636	17.49693	343.15232	16.1398	361.86152	20.590749	412.20282
6 小时	21.9369	402.3597	17.05368	352.312483	16.25364	368.23889	21.746358	426.21396
13 小时	22.03572	396.12583	17.62378	342.36954	18.03541	362.42365	21.946104	425.26085

时间	凝胶类		液态水基类		液态气雾剂类		膏霜乳液类	
	低浓度 (20 μ g)	高浓度 (400 μ g)						
18 小时	21.0084	402.33458	16.73373	338.57321	16.78989	359.49519	22.047732	428.76772
24 小时	23.75098	414.14647	18.93371	349.23645	17.23144	374.8718	21.560553	407.89422
平均	21.975342	405.240588	17.568366	345.1288006	16.890036	365.37821	21.427737	421.22588
RSD (%)	4.98	1.81	4.79	1.61	4.59	1.70	3.41	1.86

5.2 日间稳定性试验

方法一：取液态水基类，凝胶类以及膏霜乳液类样品各 0.2g，各一式两份，精密加入甲醛标准品 20 μ g、400 μ g，按供试品溶液依法制备，作为低浓度稳定性试验供试品溶液和高浓度稳定性试验供试品溶液，测定加入量，结果（见下表）表明，稳定性试验结果良好，RSD 均小于 5%。

表 11 方法一日间稳定性试验结果（单位： μ g）

时间	凝胶类		液态水基类		膏霜乳液类	
	低浓度 (20 μ g)	高浓度 (400 μ g)	低浓度 (20 μ g)	高浓度 (400 μ g)	低浓度(20 μ g)	高浓度 (400 μ g)
第一天	18.518	356.43169	18.97798	361.60925	19.93636	321.5082
第二天	20.23579	385.7372	20.87012	386.43763	19.91018	332.51068
第三天	19.36974	382.41664	20.48672	378.0894	20.26401	327.00944
平均	19.37451	374.8618433	20.11160667	375.37876	20.03685	327.00944
RSD (%)	4.43	4.28	4.97	3.37	0.98	1.68

方法二：取液态水基类，凝胶类，液态气雾剂类以及膏霜乳液类样品各 0.2g，各一式两份，精密加入甲醛标准品 20 μ g、400 μ g，按供试品溶液依法制备，作为低浓度稳定性试验供试品溶液和高浓度稳定性试验供试品溶液，测定加入量，结果（见下表）表明，稳定性试验结果良好，RSD 均小于 5%。

表 12 方法二日间稳定性试验结果（单位： μ g）

时间	凝胶类		液态水基类		液态气雾剂类		膏霜乳液类	
	低浓度 (20 μ g)	高浓度 (400 μ g)						
第一天	21.14471	411.23636	17.49693	343.15232	16.1398	361.86152	20.59075	412.202817
第二天	21.0084	402.33458	16.73373	338.57321	16.58989	359.49519	21.560553	407.89422
第三天	22.362156	410.23657	18.02367	346.28156	17.03268	362.0126	21.42397	410.23659
平均	21.50509	407.9358	17.41811	342.66903	16.58746	361.12310	21.19176	410.11121
RSD (%)	3.47	1.20	3.72	1.13	2.69	0.39	2.48	0.53

6、回收率试验

方法一回收率试验：取液态水基类，凝胶类以及膏霜乳液类样品各 0.2g，一式六份，以

两份为一组，分别精密加入甲醛标准品 20 μ g、100 μ g、400 μ g，按供试品溶液依法制备，作为低浓度、中浓度和高浓度回收率供试品溶液（添加水平相当于 0.01%、0.05%和 0.2%），依法测定，计算回收率，结果（见下表）表明，回收率试验结果均位于 85~115%之间，符合相关要求。

表 13 方法一回收率试验结果

基质类型	凝胶类	液态水基类	膏霜乳液
低浓度(0.01%)	94.090%	89.88%	104.97%
	96.727%	94.89%	110.22%
中浓度(0.05%)	91.378%	92.33%	86.28%
	94.584%	92.45%	85.54%
高浓度(0.2%)	91.608%	85.40%	92.45%
	90.295%	86.74%	92.85%

方法二回收率试验：取液态水基类，凝胶类，液态气雾剂类以及膏霜乳液类样品各 0.2g，一式六份，以两份为一组，分别精密加入甲醛标准品 20 μ g、100 μ g、400 μ g，按供试品溶液依法制备，作为低浓度、中浓度和高浓度回收率供试品溶液（添加水平相当于 0.01%、0.05%和 0.2%），依法测定，计算回收率，结果（见下表）表明，回收率试验结果均位于 85~115%之间，符合相关要求。

表 14 方法二回收率试验结果

基质类型	凝胶类	液态水基类	膏霜乳液	液态气雾剂
低浓度(0.01%)	105.724%	87.48%	95.55%	90.70%
	98.370%	88.05%	114.39%	91.18%
中浓度(0.05%)	105.385%	87.36%	112.16%	85.13%
	106.839%	85.28%	108.42%	86.75%
高浓度(0.2%)	102.809%	85.79%	104.31%	90.47%
	100.623%	89.06%	114.50%	90.58%

7、检出浓度

取液态水基类，凝胶类，液态气雾剂类以及膏霜乳液类样品各 0.2g，分别精密加入甲醛标准品 5 μ g，10 μ g，分别按照两种方法依法制备，测得信噪比均大于 3 和 10，故将 0.003%作为检出浓度，将 0.005%作为定量浓度。

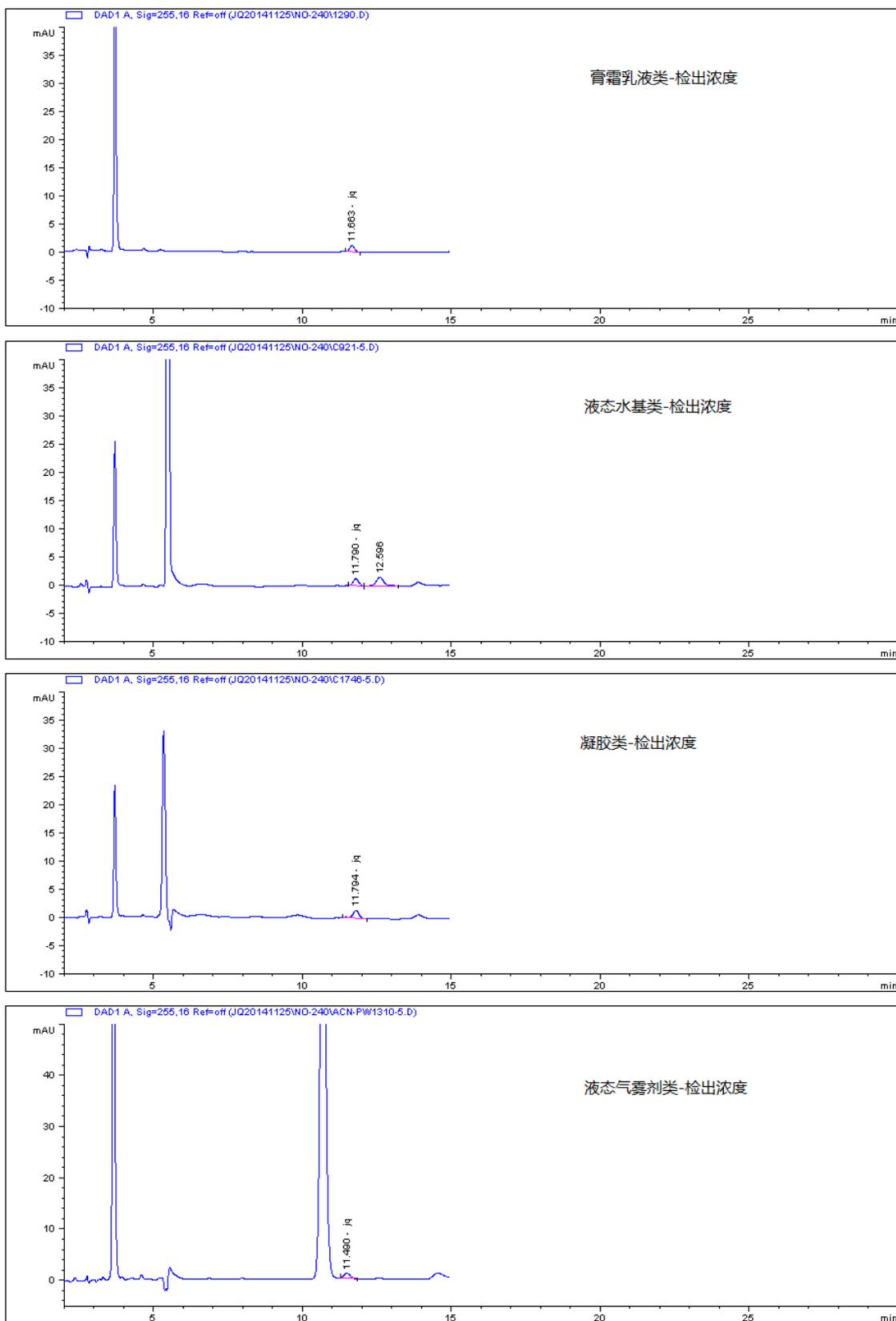


图 14 不同基质检出浓度色谱图

8、甲醛释放体实验

称取不同空白基质样品各 0.2g,一式 5 份,分别精密加入 2-溴-2-硝基丙烷-1,3-二醇、5-

溴-5-硝基-1,3-二噁烷、双(羟甲基)咪唑烷基脲、DMDM 乙内酰脲(1, 3-二羟甲基-5,5-二甲基海因)、咪唑烷基脲各 1mg,按方法一依法制备,测定甲醛含量。另称取 0.2g 基质样品,加入乌洛托品 1mg,按方法二依法制备,测定甲醛含量。结果表明,本方法有效减少了甲醛释放体在样品处理过程中额外释放的甲醛,较原方法更为接近样品中真实的游离甲醛的含量。

表 15 不同甲醛释放体实验结果

基质类型	咪唑烷基脲	双羟基咪唑烷基脲	乌洛托品	乙内酰脲	2-溴-2-硝基丙烷-1,3-二醇	5-溴-5-硝基-1,3-二噁烷
液态水基类	0.003-0.006	0.01-0.015	/	/	/	/
膏霜乳液类	0.005	0.01-0.02	0.015	/	/	/
凝胶类	0.002-0.003	0.015	/	/	/	/
液态气雾剂类	/	/	/	/	/	/
原方法(液态水基类)	0.02	0.04	0.05	/	0.01	/

9、实际样品比较

采用改进后的方法和原方法,分别对下述 26 批样品进行了测定,结果表明,改进后的方法甲醛测定结果均小于等于原方法测定结果。部分样品测定结果远低于原方法的测定结果。分析原因,应该是配方中含有的某种成分在采用原方法进行提取时,会产生干扰,而改进后的方法则有效地避免了干扰。

表 16 不同方法测定结果比较

名称	改进后方法	原方法	配方中含有的甲醛释放体			
			双(羟甲基)咪唑烷基脲	咪唑烷基脲	DMDM 乙内酰脲	2-溴-2-硝基-1,3-丙二醇
生活良品橄榄精油嫩白美体乳	461.3897	503.08814	√			
婴儿柔嫩沐浴露	208.43105	211.1647			√	
草本去屑洗发露	169.49939	191.4569			√	
大宝 SOD 清爽保湿露	319.3731	339.3581			√	
隆力奇 SOD 蜜	36.56427	32.0342				√
欧美姿 SPA 金钻活氧精华霜	—	1.80469	√			
嫩白露按摩	428.29754	441.1615		√		
相宜本草水润亮白隔离乳	—	2.16576		√		
兰采丽新祛痘面膜	112.69891	113.4006		√		
百雀羚保湿润肤霜	307.2314	308.7178			√	
百雀羚保湿滋养面霜	322.81553	322.1443			√	

名称	改进后方法	原方法	配方中含有的甲醛释放体			
			双（羟甲基） 咪唑烷基脲	咪唑烷基 脲	DMDM 乙 内酰脲	2-溴-2-硝基 -1,3-丙二醇
隆力奇蛇油膏	34.53135	35.0666				√
金缕梅控油净白爽肤水	177.59312	1432.5818	√	—	—	—
美素璀璨光润焕白亮肤水	395.59098	390.08	√			
自然汉方美白精华液	264.13726	321.8029	√			
自然美汉方草本系列	470.96208	463.9042	√	√		
清痘调理爽肤水	—	2.52372			√	
茶树祛痘水	28.14241	10.4406				√
欧美姿臻品丝膜	191.46065	190.5386		√		
腋留芳狐臭水	—	—				
百雀羚清痘调理爽肤水	—	—				
明荃狐臭净	1458.30475	3068.0718				
皓运多康狐臭半月清（喷雾）	407.00161	2965.45				
趣味狐臭液（喷雾）	40.37554	19.8136				
多芬丰盈宠肤沐浴乳 椰乳和蔓茉莉	105.5	360			√	
隆力奇蛇油宝宝霜	51.2	121.2	√			

（四）、 高效液相色谱-柱后衍生

方法原理：溶液中的甲醛经色谱分离后，采用柱后衍生进行 DAD 检测。该方法可以避免甲醛释放体由于衍生破坏的平衡而额外产生的甲醛。缺点是对供试品溶液的进样时间有一定的要求，需要避免甲醛释放体随时间的增加而进一步释放甲醛。此外，由于甲醛保留较弱，部分基质复杂样品可能分离效果较差。

一、 供试品溶液制备方法及方法适用范围

欧盟方法采用盐酸与氯仿进行提取，盐酸溶液进样分析。由于盐酸为易制毒试剂，氯仿毒性较大，不适合实验室的常规实验。根据前述实验研究结果，酸性条件可以有效限制咪唑烷基脲和双羟基咪唑烷基脲类甲醛释放体释放甲醛，采用 0.2% 磷酸溶液提取样品。具体如下：

精密称取样品 0.2g，置 10mL 具塞比色管中，加 0.2% 磷酸溶液至刻度，涡旋 1min，离心，取上清液，即可。

由于本方法前处理采用了 0.2% 的磷酸水溶液作为提取溶剂，因此，不适用于配方中含

有遇酸分解甲醛的物质的样品（比如乌洛托品）中游离甲醛的测定，也不适用于液态气雾剂类样品中游离甲醛的测定。

二、分析条件

参照欧盟方法，以乙酰丙酮作为衍生溶剂（由于乙酰丙酮在 420nm 吸收较弱，而衍生物具有明显的黄色，因此，适合做柱后衍生溶剂）。衍生条件为：100℃，0.5mL/min。

检测波长：选用最大吸收波长 420nm 作为测定波长。

流动相的考察：分别采用 0.006mol/L 磷酸二氢钠（磷酸调节 pH 为 2.1），0.2%磷酸作为流动相，结果无明显差异，选用后者为流动相。

柱温的考察：由于甲醛保留较弱，柱温定为 20℃，可以有效提高分离效果。

不同色谱柱的考察：分别考察了 INERTSIL-ODS-SP，Spursil C18（DIKMA），LiChrospher60 RP-select B(MERK)，结果无明显差异。以 INERSIL-ODS-SP 进行方法学考察。

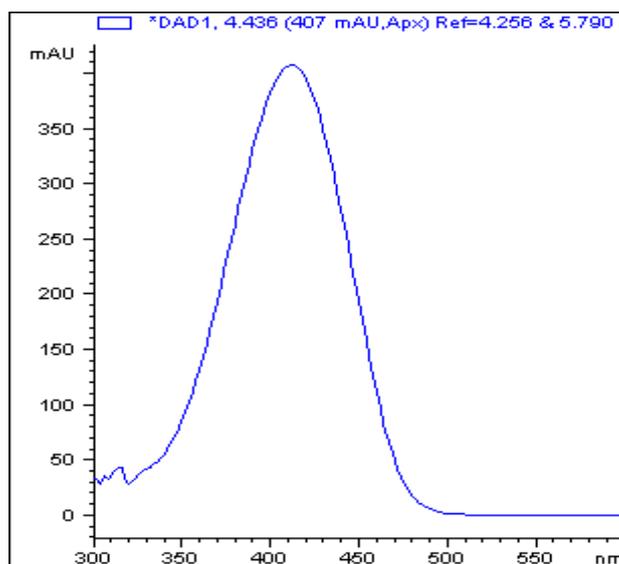
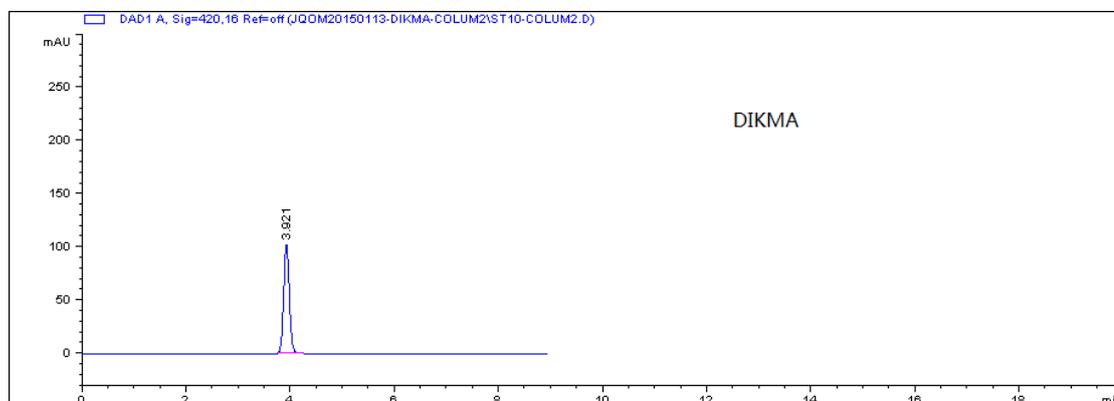


图 15 甲醛和乙酰丙酮衍生物的 DAD 图



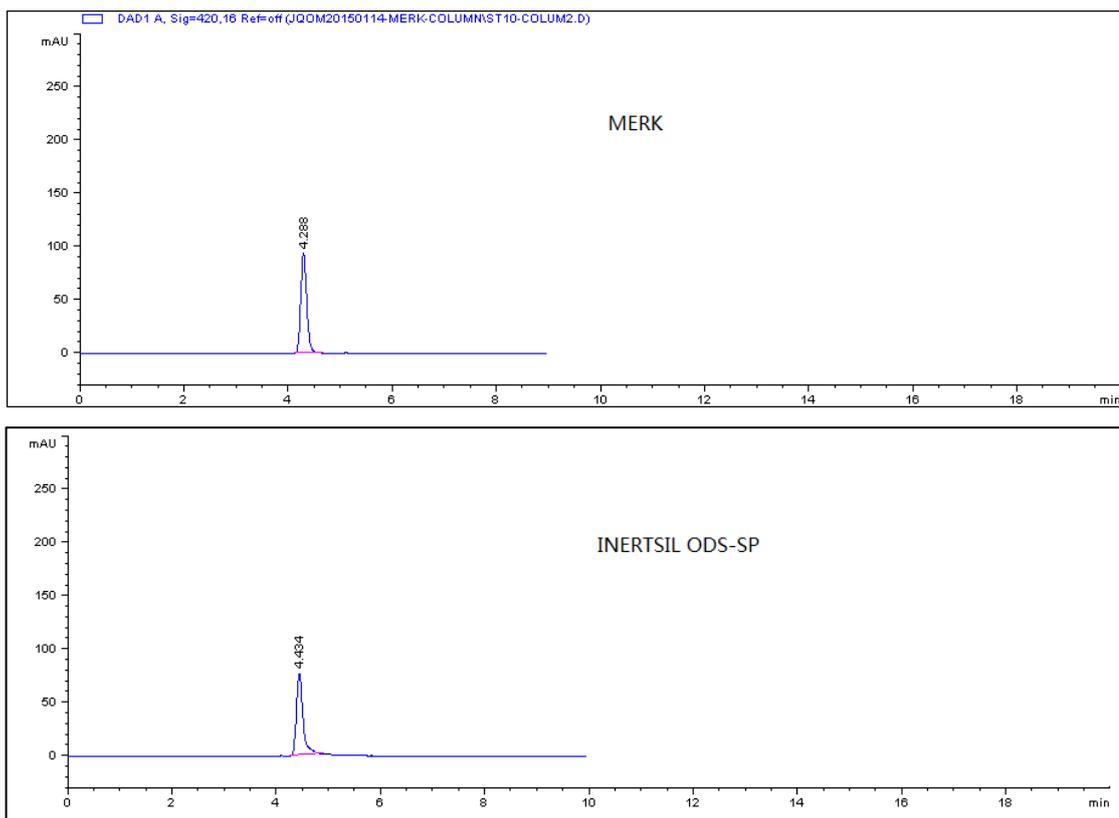
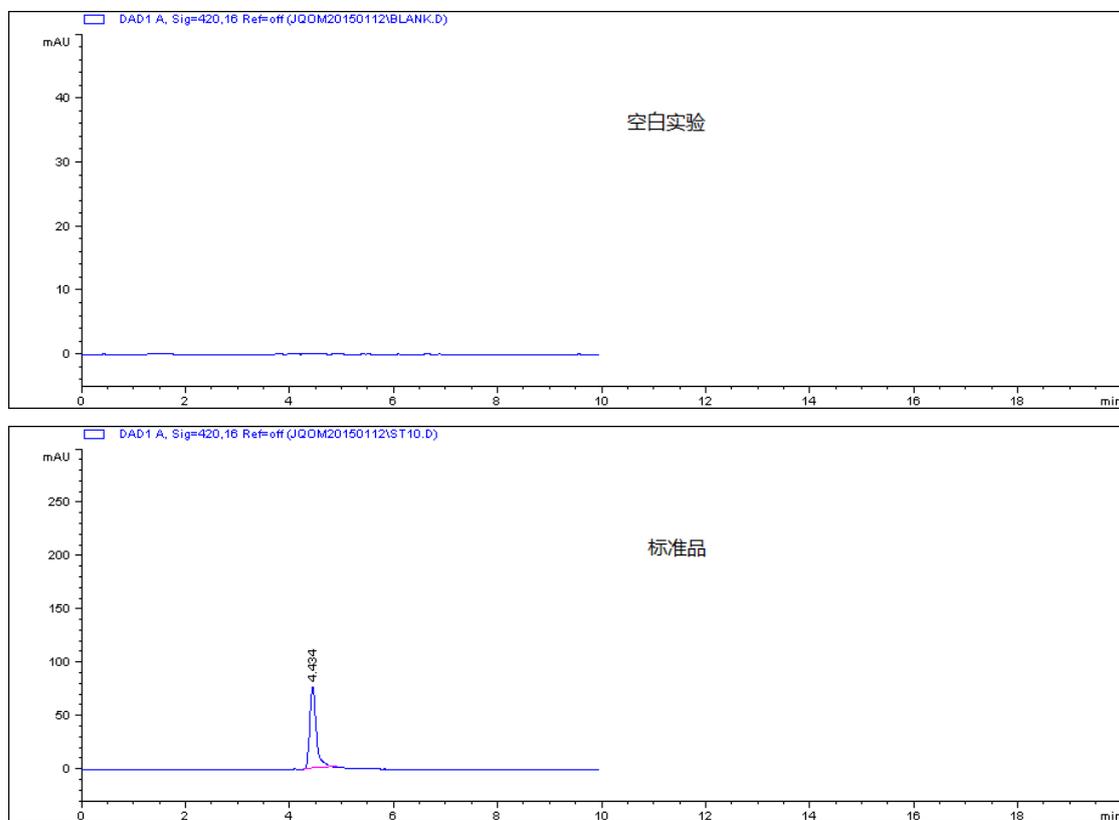
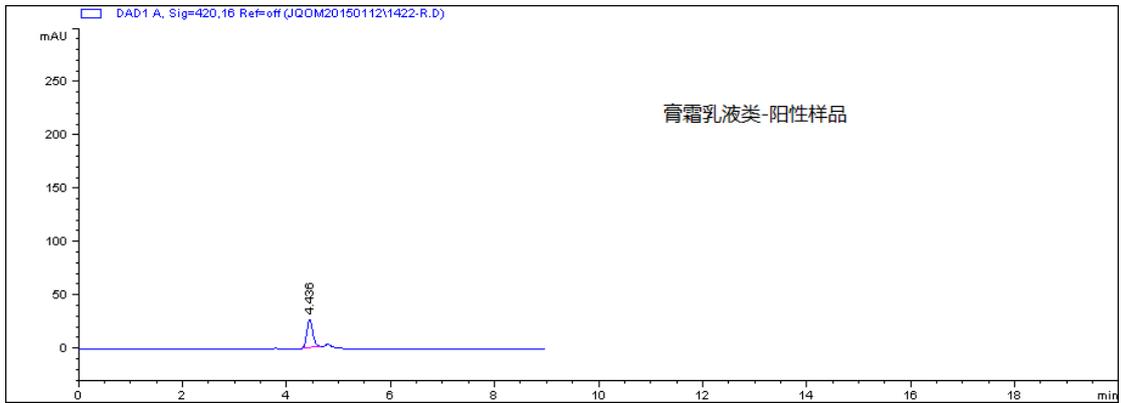
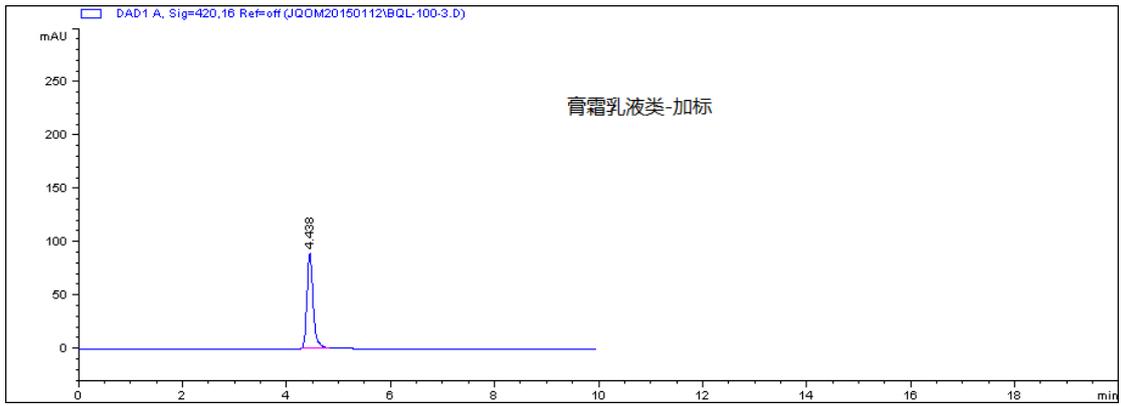
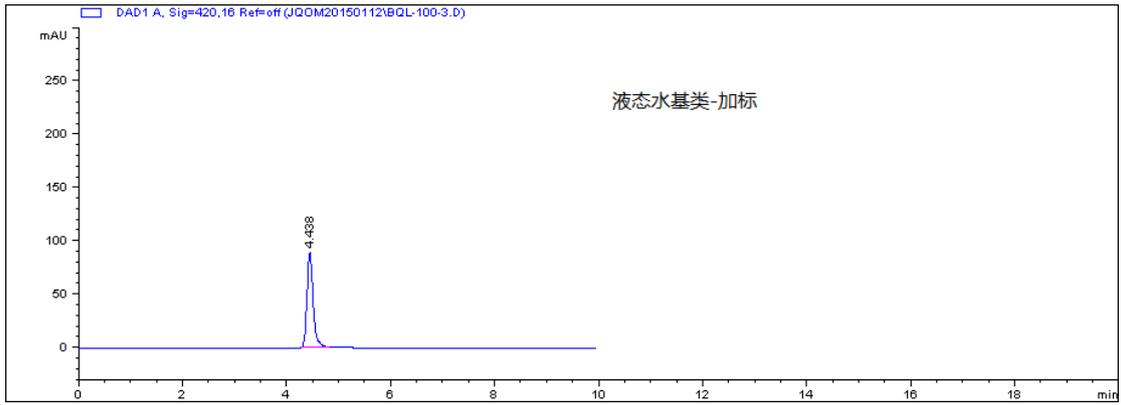
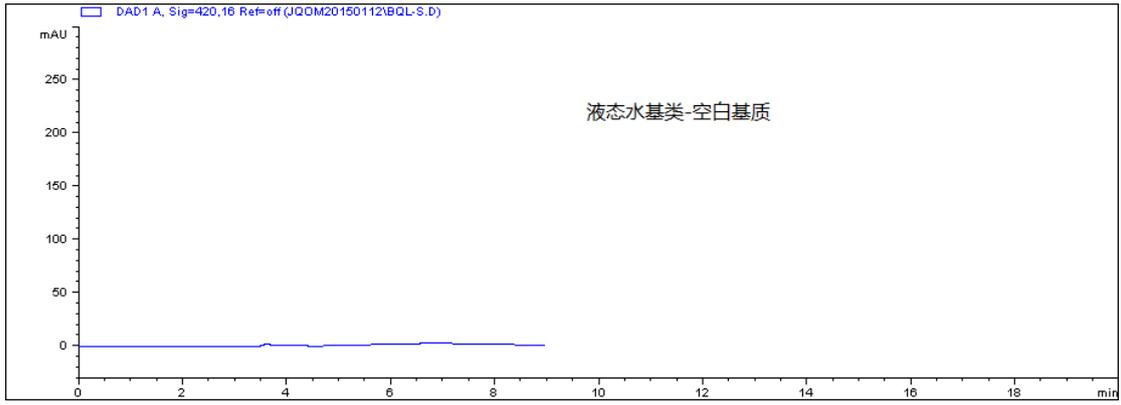


图 16 不同色谱柱的色谱图

特异性试验：采用本方法进行试验，结果表明，空白基质无干扰。





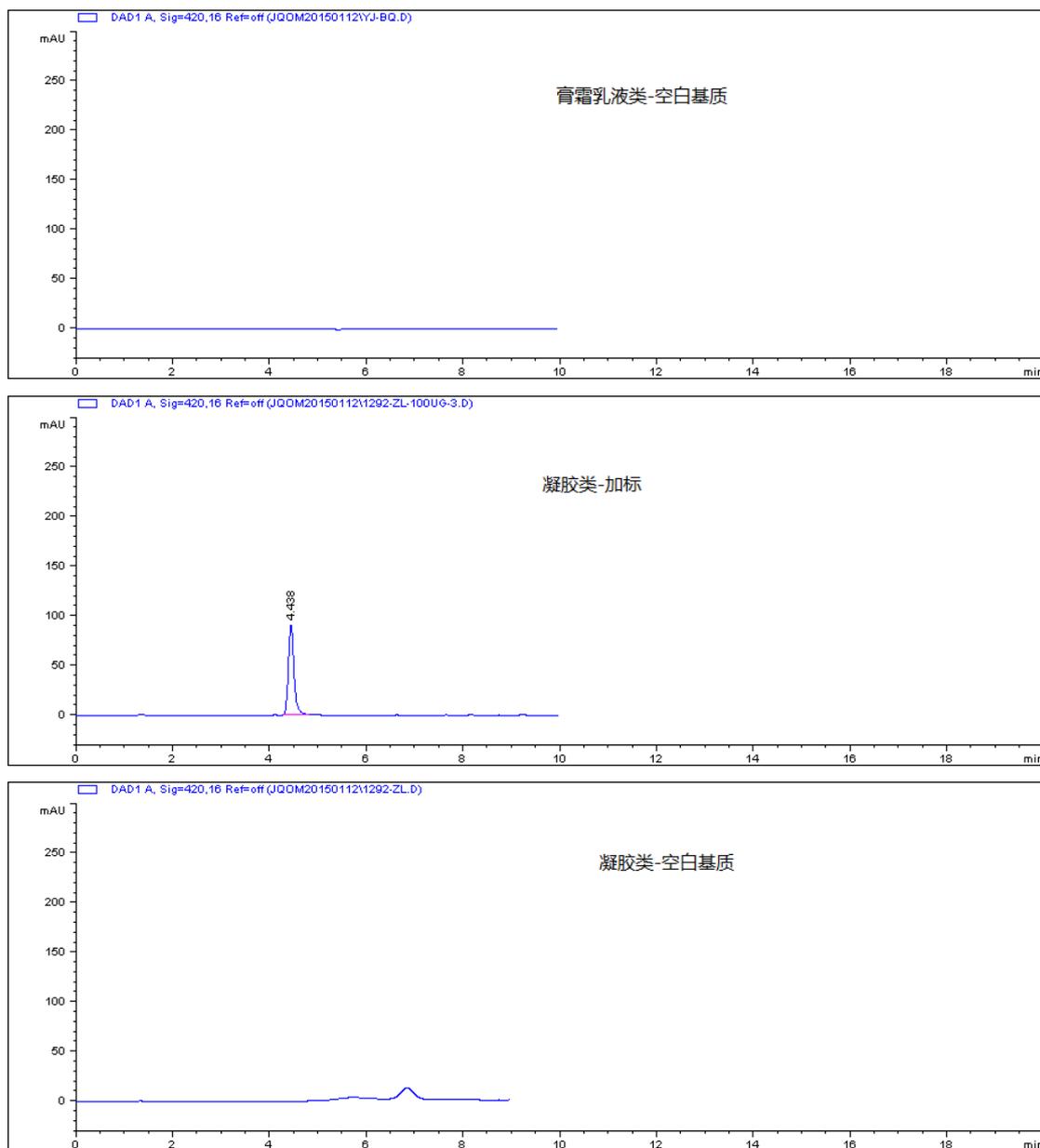


图 17 标准品、空白基质、加标样品、阳性样品色谱图

三、甲醛释放体试验

精密称取基质样品（膏霜乳液类）0.2g，置 10mL 具塞比色管中，分别加入下述甲醛释放体各 1mg，再加 0.2%磷酸溶液至刻度，涡旋 1min，离心，取上清液，依法测定，结果表明，甲醛释放体产生的甲醛远小于原方法测定结果。由于样品处理过程中加入磷酸水溶液，因此，本法不适用于配方中含有乌洛托品等遇酸分解甲醛的物质的样品中游离甲醛的测定，也不适用于液态气雾剂类样品中游离甲醛的测定。

表 17 甲醛释放体试验结果

甲醛释放体	测得甲醛 (%)
乌洛托品	0.09

甲醛释放体	测得甲醛 (%)
咪唑烷基脲	0.003
双羟基咪唑烷基脲	0.008
5-溴-5-硝基-1,3-二恶烷	0
溴硝醇	0
乙内酰脲	0

四、方法学研究

1、线性

取甲醛标准储备液，用 0.2% 磷酸稀释成 1 μ g/mL、2 μ g/mL、5 μ g/mL、10 μ g/mL、20 μ g/mL、50 μ g/mL 的标准系列溶液，相当于样品中甲醛含量为 50 μ g/g、100 μ g/g、250 μ g/g、500 μ g/g、1000 μ g/g、2500 μ g/g。以进样浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，结果表明线性良好。

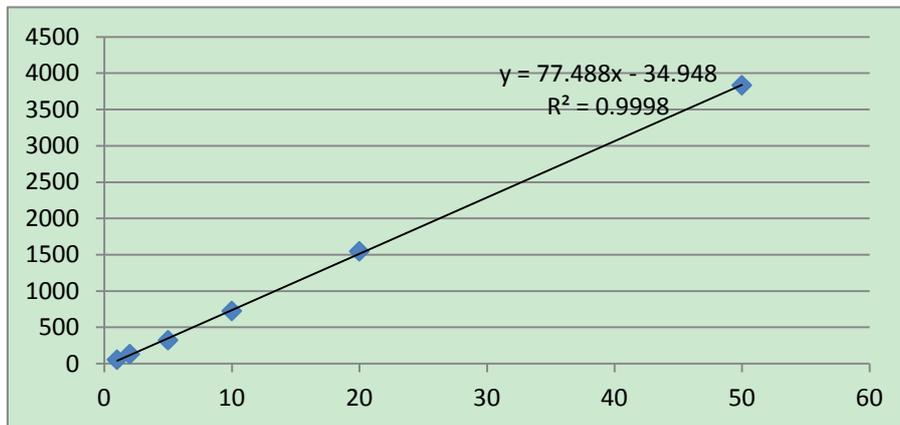


图 18 线性关系

2、重复性试验

取液态水基类，凝胶类以及膏霜乳液类样品各 0.2g，一式六份，分别精密加入甲醛标准品 100 μ g，按供试品溶液依法制备，作为重复性试验供试品溶液（添加水平相当于 0.05%），依法测定，结果（见下表）表明，重复性试验结果符合相关要求。

表 18 重复性试验结果（单位 μ g）

基质类型	凝胶类	膏霜乳液	液态水基类
1	101.8678	121.778	97.3449
2	99.0054	119.0653	98.3596
3	99.7138	130.5887	98.3146
4	97.041	128.7432	98.6423
5	105.8925	133.0081	99.4313
6	102.7622	131.5439	99.5611
平均	101.04712	127.45453	98.60897
RSD (%)	3.10	4.46	0.83

3、回收率试验

取液态水基类，凝胶类以及膏霜乳液类样品各 0.2g，一式六份，以两份为一组，分别精密加入甲醛标准品 20、100、400 μ g，按供试品溶液依法制备，作为低浓度、中浓度和高浓度回收率供试品溶液（添加水平相当于 0.01%、0.05%和 0.2%），依法测定，计算回收率，结果（见下表）表明，回收率试验结果均位于 85~115%之间，符合相关要求。

表 19 回收率试验结果

基质类型	凝胶类	膏霜乳液	液态水基类
低浓度(0.01%)	104.779%	95.32%	103.77%
	108.321%	112.57%	104.55%
中浓度(0.05%)	101.868%	98.47%	97.34%
	99.005%	105.02%	98.36%
高浓度(0.2%)	96.300%	94.75%	98.18%
	97.298%	97.96%	98.03%

4、精密度试验

4.1 日内精密度试验：取 1 μ g/mL 和 50 μ g/mL 的标准品溶液分别作为低浓度精密度试验用供试品溶液和高浓度精密度试验用供试品溶液，连续进样 6 次，记录峰面积，计算 RSD，结果符合相关要求。

表 20 日内精密度试验结果

编号	低浓度	高浓度
1	54.02355	3832.65771
2	54.03287	3826.24754
3	54.36955	3953.1485
4	55.23684	3827.12475
5	54.31594	3917.12421
6	54.76981	3921.12241
平均	54.45809333	3879.570853
RSD (%)	0.86	1.47

4.2 日间精密度试验：取 1 μ g/mL 和 50 μ g/mL 的标准品溶液分别作为低浓度精密度试验用供试品溶液和高浓度精密度试验用供试品溶液，每日测定 1 次，连续测定 3 日，记录峰面积，计算 RSD，结果符合相关要求。

表 21 日间精密度试验结果

编号	低浓度 (1ng/mL)	高浓度 (50ng/mL)
第一天	54.02355	3832.66
第二天	54.64304	3746.28
第三天	54.78614	3879.65

平均	54.48424	3819.53
RSD (%)	0.74	1.77

5、稳定性试验

取液态水基类，凝胶类以及膏霜乳液类样品各 0.2g，各一式两份，精密加入甲醛标准品 20 μ g、400 μ g，按供试品溶液依法制备，作为低浓度稳定性试验供试品溶液和高浓度稳定性试验供试品溶液，测定样品溶液中甲醛的浓度，结果（见下表）表明，日内稳定性试验结果良好，均小于 5%。而阳性样品的稳定性结果表明，随着样品放置时间的延长，测定结果会逐渐缓慢增大，增大的幅度随样品中甲醛释放体的含量而有所不同，为了保证测定结果最为接近样品中的真实含量，样品最好在当天测定完毕。

表 22 日内稳定性试验（单位： μ g/mL）

时间	凝胶类		液态水基类		膏霜乳液类	
	低浓度	高浓度	低浓度	高浓度	低浓度	高浓度
0 小时	2.09557	38.51996	2.07542	39.27082	5.52219	43.56937
4 小时	2.16641	38.91916	2.09096	39.21054	5.49936	42.34719
7 小时	2.19137	39.40582	2.15018	39.7553	5.69173	43.33901
12 小时	2.25167	40.22177	2.15956	40.62524	5.92791	44.70223
20 小时	2.31227	40.71971	2.20494	39.77119	6.12921	44.84713
平均	2.203458	39.557284	2.136212	39.726618	5.75408	43.760986
RSD (%)	2.93	1.85	1.97	1.65	3.44	2.21

表 23 日间稳定性试验

时间	凝胶类		液态水基类		膏霜乳液类	
	低浓度 (20 μ g)	高浓度 (400 μ g)	低浓度 (20 μ g)	高浓度 (400 μ g)	低浓度 (20 μ g)	高浓度 (400 μ g)
第一天	2.09557	38.51996	2.07542	39.27082	5.52219	43.56937
第二天	2.31227	40.71971	2.20494	39.77119	6.12921	44.84713
第三天	2.33158	41.03258	2.30011	40.03584	6.32589	45.32684
平均	2.246473	40.09075	2.19349	39.69267	5.99243	44.58111
RSD (%)	5.83	3.42	5.14	0.98	6.99	2.04

表 24 阳性样品稳定性试验（配方中含有咪唑烷基脲或双羟基咪唑烷基脲）

时间	阳性样品 1	阳性样品 2	阳性样品 3	阳性样品 4
0 小时	2.99183	2.69833	1.61444	1.422206
8 小时	3.059295	2.7412	1.74906	1.44751
8 小时平均	3.0255625	2.719765	1.68175	1.434858
RSD(%)	1.58	1.11	5.66	1.25
20 小时	3.30816	3.03212	1.89307	1.47602
20 小时平均	3.11976	2.82388	1.75219	1.44858
RSD(%)	5.340	6.431	7.952	1.859

第二天	4.11302	4.85905	2.75823	1.53906
第三天	4.58068	4.04337	2.81908	1.53023
平均	3.610597	3.474814	2.166776	1.4830052
RSD(%)	19.445	27.212	26.610	3.435

6、检出浓度

取液态水基类,凝胶类以及膏霜乳液类样品各 0.2g, 分别精密加入甲醛标准品 5 μ g, 10 μ g, 按供试品溶液制备方法依法制备, 作为检出浓度和定量浓度试验供试品溶液, 测得信噪比均大于 3 和 10, 故将 0.003%作为检出浓度, 将 0.005%作为定量浓度。

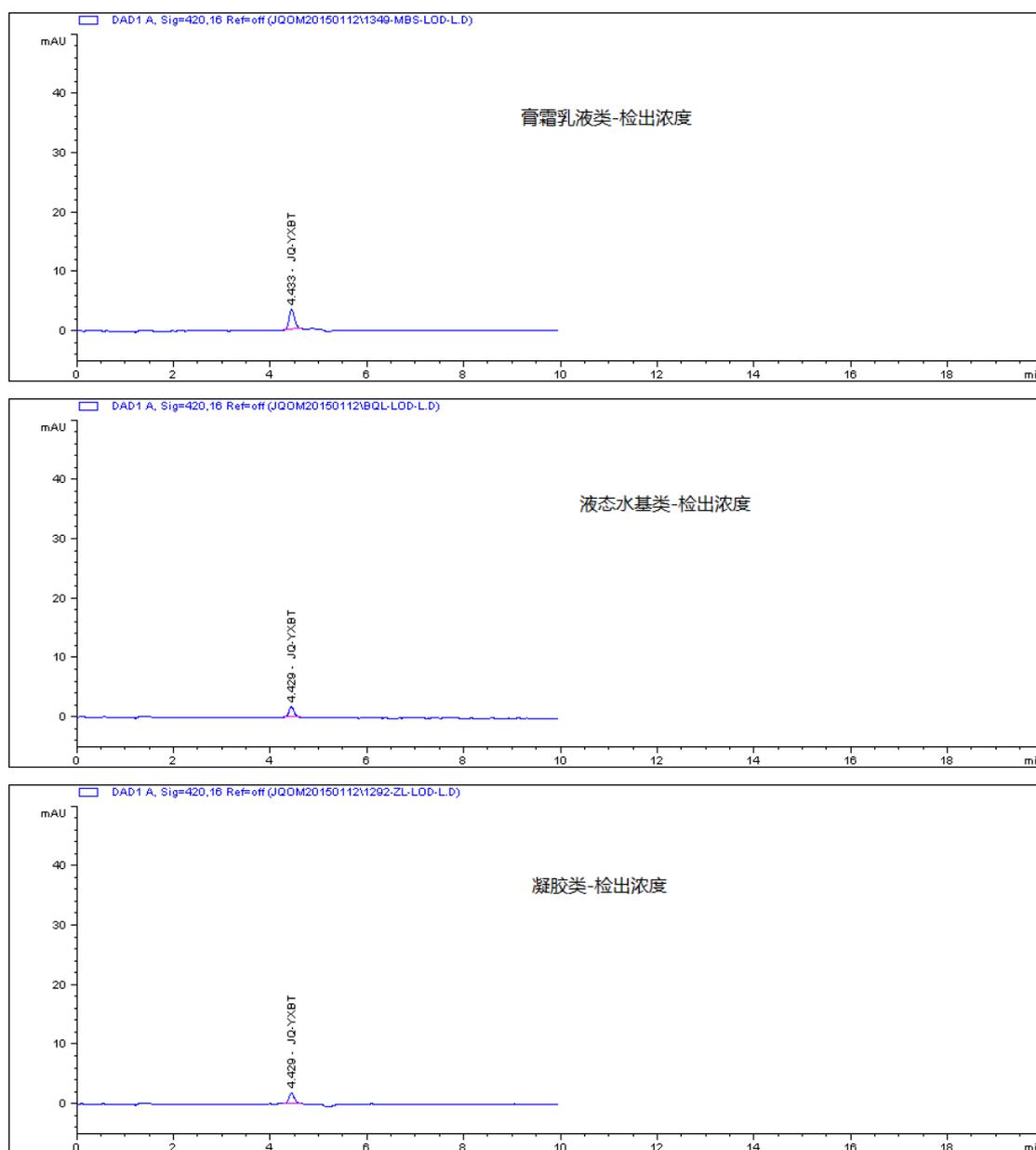


图 19 检出浓度色谱图

7、样品测定

对如下阳性样品分别采用 3 种方法测定, 结果表明, 五氟苯胍-柱前衍生和柱后衍生法

测得数据较为接近，部分样品的测定结果低于原方法测定结果。

表 25 阳性样品不同方法测定结果

单位 (µg/g)	96 号文	柱后衍生	柱前衍生
隆力奇宝宝润肤霜	121	71	51
金缕梅水	1432	100	177
美素焕白亮肤水	390	329	395
大宝 SOD 蜜	339	244	319
多芬沐浴露	360	150	105
茶树祛痘水	10	5.5	28
百雀羚保湿霜	307	215	308
百雀羚滋养面霜	322	236	322
篮彩丽新面膜	113	62	112
婴儿沐浴露	211	130	208
隆力奇 SOD 蜜	35	50	34

五、其他需说明的事项

由于乌洛托品遇酸迅速分解出甲醛，故不适用采用上述方法进行。实验中采用乙腈进行乌洛托品标准溶液的制备，结果峰形不佳，重复性及耐用性较差。故本方法不适用于配方含有乌洛托品等遇酸会分解甲醛的物质的样品中甲醛的测定。

(五) 阳性样品的确证

5.1 液相色谱-质谱阳性确证

本实验采用 Agilent6495 三重四级杆质谱仪进行确证。

色谱参考条件如下：

色谱柱：ZOBAX SB- C₁₈ 柱(2.1 mm×150 mm, 3.5 µm)，或等效色谱柱；

流动相 A：水；

流动相 B：乙腈；

流动相梯度洗脱程序：

表 26 流动相梯度洗脱程序

	Time	A	B	Flow
1	1.00 min	90.00 %	10.00 %	0.3 mL/min
2	3.00 min	40.00 %	60.00 %	0.3 mL/min
3	6.00 min	0.00 %	100.00 %	0.3 mL/min
4	8.00 min	0.00 %	100.00 %	0.3 mL/min
5	8.10 min	90.00 %	10.00 %	0.3 mL/min

流速：0.3 mL/min;

柱温：25 °C;

进样量：10 μL。

质谱参考条件如下：

离子源：电喷雾离子源（ESI 源）；

监测模式：负离子监测模式；

气流温度：160°C

鞘气温度：350°C

雾化气压力：30 psi；

毛细管电压：1500V；

碰撞气：氮气；

其它质谱条件参见表 27；

表 27 三重四极杆离子对及相关电压参数设定表

物质名称	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	CE (V)
五氟苯胺	209	189	5
		167	17

5.2 定性判定

用液相色谱-串联质谱法对样品进行定性判定，在相同试验条件下，样品中各离子对的保留时间应与标准溶液中各离子对的保留时间一致；样品色谱图中所选择的监测离子对的相对丰度比与相当浓度标准溶液的离子对相对丰度比的偏差不超过表 28 规定范围，则可以判断样品中存在甲醛。

表 28 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度 (k)	k≥50%	50%>k≥20%	20%>k≥10%	k≤10%
允许的最大偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

5.3 色谱图

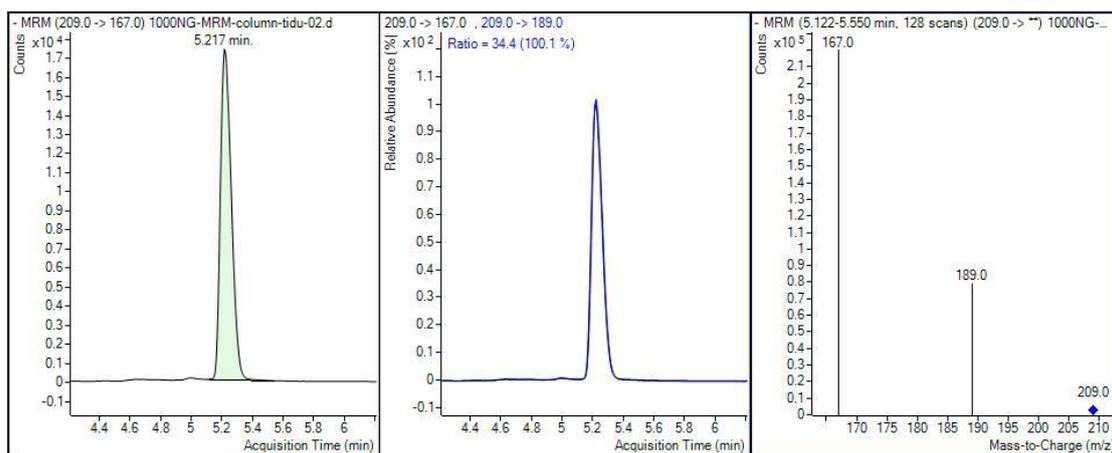


图 20 阳性样品监测离子对色谱图

(六) 检测方法的选择

第一法较国食药监许【2011】96号文方法的改进之处在于：1) 采用酸性溶剂进行提取，有效抑制了甲醛释放体产生额外的甲醛；2) 选择反应迅速的五氟苯肼作为衍生剂，有效减少了样品前处理过程的时间，简化了操作步骤；3) 采用有机溶剂提取衍生物，快速将甲醛与五氟苯肼的衍生物转移至有机相中，避免了甲醛释放体由于平衡破坏而产生多余的甲醛。本法较国食药监许【2011】96号文方法相比，有效减少了甲醛释放体在提取过程中额外释放的甲醛。

第二法采用柱后衍生法进行测定，避免了甲醛释放体（除乌洛托品外）由于衍生反应破坏的平衡而额外释放的甲醛。由于甲醛释放体在溶液状态下会缓慢释放甲醛，采用酸性溶剂可以有效抑制甲醛释放体（除乌洛托品外）在提取过程中额外产生甲醛的速度。由于乌洛托品遇酸会迅速分解为甲醛，因此，本法不适用于配方中含有乌洛托品等遇酸会分解甲醛的物质的样品中游离甲醛的测定。

第一法和第二法的测定结果接近，但对于甲醛释放体含量较高或者含有1种以上的甲醛释放体的样品而言，第一法的测定结果有可能会略高于第二法的测定结果。因此，当遇到不合格样品时，建议采用第二法进行复核，且样品应立即进样分析。

(七) 实验室间验证

浙江省食品药品检验研究院，辽宁省药品检验检测院，广西壮族自治区食品药品检验所按照《化妆品中禁用物质和限用物质检测方法验证技术规范》(国食药监许[2010]455号文)的要求分别对修订后的方法进行了验证。

结果表明，本方法在 0.005%~0.2% 范围内线性关系良好，若取 0.2g 样品进行测定，本方法检出浓度为 0.003%，定量浓度为 0.005%。

表 29 柱前衍生法 3 家单位验证结果

验证单位	浙江院		辽宁院		广西所	
	方法一	方法二	方法一	方法二	方法一	方法二
线性	良好	良好	良好	良好	良好	良好
重复性	2.4-4.3	1.1-1.3	3.2-4.4	0.7-3.1	2.2-2.6	1.4-2.0
日内精密度	0.09-1.4	0.2-0.9	0.4-2.4	0.4-0.5	0.4-0.7	0.5-0.6
日间精密度	0.4-3.8	0.3-4.5	3.7-4.8	0.5-4.1	1.2-1.5	1.8-2.2
日内稳定性	0.7-3.9	0.6-4.2	1.1-3.3	0.1-4.9	0.9-2.3	1.0-1.8
日间稳定性	0.4-4.5	0.4-3.3	2.0-4.3	0.4-4.2	0.5-4.1	1.2-3.0
回收率	90.4-99.7	85.5-95.1	85.6-112.4	85.1-106.2	87.3-101.7	89.2-114.7
检出浓度	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求

表 30 柱后衍生法 3 家单位验证结果

验证单位	浙江院	辽宁院	广西所
线性	良好	良好	良好
重复性	0.3-1.4	0.2-0.4	0.3-0.5
日内精密度	0.2-0.3	0.1-0.2	0.1-0.2
日间精密度	0.7-2.1	0.1-0.3	1.3-1.9
日内稳定性	1.5-2.9	0.2-1.4	0.1-0.3
回收率	95.9-111.0	95.6-102.8	98.4-107.2
检出浓度	符合要求	符合要求	符合要求

经验证，该方法的特异性、检出限、线性范围、回收率、精密度、稳定、重复性等各项指标均满足国食药监许[2010]455 号《化妆品中禁用物质和限用物质检测方法验证技术规范》要求。

(八) 专家委员会评审结论

2015 年 7 月，本方法经化妆品标准专家委员会评审，提出如下意见：(1)、2 种衍生物稳定性数据提供；(2)、表 25 异常结果解释。

针对上述意见，我所对相关资料以及实验数据进行了补充完善，并提交了对评审意见的回复。

2015 年 9 月 16 日，经化妆品标准专家委员会再次评审，一致认为我所提交的资料内容完整，能够对评审意见进行科学合理的解释。

综上，我所已完成对《化妆品中甲醛的检测方法》的修订工作。

附：关于对《化妆品中甲醛的检测方法》化妆品标准专家委员会专家意见的回复

一、2种衍生物稳定性数据的说明

(一) 柱前衍生法

样品中的游离甲醛与五氟苯肼反应生成五氟苯腙，经高效液相色谱分离，在 255 nm 波长下检测，根据保留时间定性，峰面积定量。标准中收录了 2 种不同的前处理方法，根据样品配方中是否含有遇酸可以分解产生甲醛的成分，选择合适的前处理方法。

1、编制说明中的表 9、表 11 分别列出了柱前衍生法（方法一）所得供试品溶液中衍生产物（五氟苯腙）的日内及日间稳定性数据，结果表明，甲醛与五氟苯肼的衍生产物（五氟苯腙）稳定性良好，RSD 均小于 5%。

表 1（编制说明表 9） 衍生产物五氟苯腙（方法一）日内稳定性试验结果（单位：μg）

时间	凝胶类		液态水基类		膏霜乳液类	
	低浓度 (20μg)	高浓度 (400μg)	低浓度 (20μg)	高浓度 (400μg)	低浓度 (20μg)	高浓度 (400μg)
0 小时	18.818	356.43169	18.97798	341.60925	17.48246	321.5082
6 小时	20.41624	365.54252	19.62428	347.68109	19.13636	323.29324
13 小时	19.34352	368.1237	19.62327	375.3294	17.91489	330.72824
18 小时	19.89624	382.0124	19.8743	379.2364	19.39298	330.72824
25 小时	20.23579	385.7372	20.87012	376.43763	19.21018	332.51068
平均	19.741958	371.569502	19.79399	364.058754	18.627374	327.75372
RSD (%)	3.34	3.26	3.47	4.92	4.65	1.52

表 2（编制说明表 11） 衍生产物五氟苯腙（方法一）日间稳定性试验结果（单位：μg）

时间	凝胶类		液态水基类		膏霜乳液类	
	低浓度 (20μg)	高浓度 (400μg)	低浓度 (20μg)	高浓度 (400μg)	低浓度(20μg)	高浓度 (400μg)
第一天	18.518	356.43169	18.97798	361.60925	19.93636	321.5082
第二天	20.23579	385.7372	20.87012	386.43763	19.91018	332.51068
第三天	19.36974	382.41664	20.48672	378.0894	20.26401	327.00944
平均	19.37451	374.8618433	20.11160667	375.37876	20.03685	327.00944
RSD (%)	4.43	4.28	4.97	3.37	0.98	1.68

2、编制说明中的表 10、表 12 分别列出了柱前衍生法（方法二）所得供试品溶液中衍生产物的日内及日间稳定性数据，结果表明，甲醛与五氟苯肼的衍生产物（五氟苯腙）稳定性良好，RSD 均小于 5%。

表 3（编制说明表 10） 衍生产物五氟苯腙（方法二）日内稳定性试验结果（单位：μg）

时间	凝胶类		液态水基类		液态气雾剂类		膏霜乳液类	
	低浓度 (20μg)	高浓度 (400μg)	低浓度 (20μg)	高浓度 (400μg)	低浓度 (20μg)	高浓度 (400μg)	低浓度 (20μg)	高浓度 (400μg)

0 小时	21.14471	411.23636	17.49693	343.15232	16.1398	361.86152	20.590749	412.20282
6 小时	21.9369	402.3597	17.05368	352.312483	16.25364	368.23889	21.746358	426.21396
13 小时	22.03572	396.12583	17.62378	342.36954	18.03541	362.42365	21.946104	425.26085
18 小时	21.0084	402.33458	16.73373	338.57321	16.78989	359.49519	22.047732	428.76772
24 小时	23.75098	414.14647	18.93371	349.23645	17.23144	374.8718	21.560553	407.89422
平均	21.975342	405.240588	17.568366	345.1288006	16.890036	365.37821	21.427737	421.22588
RSD (%)	4.98	1.81	4.79	1.61	4.59	1.70	3.41	1.86

表 4 (编制说明表 12) 衍生产物五氟苯腈 (方法二) 日间稳定性试验结果 (单位: μg)

时间	凝胶类		液态水基类		液态气雾剂类		膏霜乳液类	
	低浓度 (20 μg)	高浓度 (400 μg)						
第一天	21.14471	411.23636	17.49693	343.15232	16.1398	361.86152	20.59075	412.202817
第二天	21.0084	402.33458	16.73373	338.57321	16.58989	359.49519	21.560553	407.89422
第三天	22.362156	410.23657	18.02367	346.28156	17.03268	362.0126	21.42397	410.23659
平均	21.50509	407.9358	17.41811	342.66903	16.58746	361.12310	21.19176	410.11121
RSD (%)	3.47	1.20	3.72	1.13	2.69	0.39	2.48	0.53

3、补充实验数据

根据评审意见,重新对衍生溶液(五氟苯腈溶液),衍生产物(五氟苯腈)的稳定性进行考察(分别采用甲醛标准品、4种不同基质样品进行衍生产物的稳定性考察,测定条件同检测标准),结果表明,甲醛与五氟苯腈的衍生产物(五氟苯腈)稳定性良好,RSD均小于5%。

表 5 衍生溶液及衍生产物 (方法一) 稳定性结果 (峰面积)

时间	0H	8H	16H	第二日	第三日	平均	RSD (%)
衍生溶液	1314.56	1379.88	1432.32	1436.16	1374.69	1387.52	3.6%
低浓度甲醛衍生产物	45.97	46.76	44.95	43.52	42.50	44.74	3.9%
高浓度甲醛衍生产物	2452.24	2358.01	2294.93	2270.20	2254.36	2325.95	3.5%
液态水基类样品衍生产物	635.86	628.6	651.34	683.66	648.21	649.53	3.3%
膏霜乳液类样品衍生产物	548.39	556.13	551.35	569.83	558.89	556.92	1.5%
凝胶类样品衍生产物	1128.78	1136.54	1148.54	1125.66	1143.67	1136.64	0.9%

表 6 衍生溶液及衍生产物 (方法二) 稳定性结果 (峰面积)

时间	0H	8H	16H	第二日	第三日	平均	RSD (%)
衍生溶液	1198.23	1208.34	1216.88	1199.45	1177.43	1200.07	1.2%

低浓度甲醛衍生产物	49.78	51.24	48.99	49.67	50.34	50.00	1.7%
高浓度甲醛衍生产物	2388.09	2357.47	2388.56	2406.51	2398.57	2387.84	0.8%
液态水基类样品衍生产物	612.78	634.55	641.34	638.68	649.55	635.38	2.2%
膏霜乳液类样品衍生产物	505.67	523.41	528.65	530.56	528.4	523.34	2.0%
凝胶类样品衍生产物	1176.68	1144.67	1198.45	1167.45	1153.42	1168.13	1.8%
液态气雾剂类(加标)	2189.34	2156.77	2093.67	2230.67	2251.89	2184.468	2.9%

(二) 柱后衍生法

样品中的游离甲醛经高效液相色谱分离，与乙酰丙酮衍生溶液在柱后作用生成黄色的衍生产物（3,5-二乙酰基-1, 4 二氢卢剔啶），在 420 nm 波长下检测，根据保留时间定性，峰面积定量。

1、乙酰丙酮衍生溶液的稳定性

本标准中乙酰丙酮衍生溶液的配制方法同欧盟分析方法（90/207/EEC），欧盟标准中指出本衍生溶液 25℃可稳定保存 3 天。化妆品卫生规范 2007 年版中甲醛测定方法项下乙酰丙酮的配制方法与本标准中的配制方法相似（25g 乙酰丙酮，加冰乙酸 3mL，乙酰丙酮 0.2mL，用水定容至 100mL），化妆品卫生规范 2007 年版标准中注明衍生溶液于冰箱内保存可稳定使用 1 个月。综上，可证明本标准中记载的乙酰丙酮衍生溶液 3 天内基本稳定。

为了进一步说明乙酰丙酮溶液的稳定性，采用高效液相色谱法（C18 色谱柱，流动相为甲醇，检测波长 274nm，柱温 30℃）对乙酰丙酮衍生溶液进行了测定，结果（见下表）表明，室温下 3 天内该衍生溶液稳定性良好，RSD 小于 5%。

表 7 乙酰丙酮的稳定性结果（峰面积）

时间	乙酰丙酮衍生溶液
0H	354.73
8H	359.24
16H	361.23
第二日	358.46
第三日	351.29
平均	356.62
RSD (%)	1.3%

2、甲醛与乙酰丙酮衍生物的稳定性考察

本标准采用柱后衍生法测定化妆品中的游离甲醛，即甲醛经色谱分离，与乙酰丙酮衍生后立即进入检测器进行检测，因此，衍生产物无法采用柱后法的色谱条件进行稳定性考察。为了进一步考察衍生产物的稳定性，模拟柱后衍生条件，将甲醛标准品与3种基质的样品分别与乙酰丙酮衍生溶液在100℃条件下加热反应5分钟，用紫外光谱仪测定吸光度。结果表明，3小时之内衍生产物稳定性良好，RSD均小于5%。

表8 甲醛与乙酰丙酮衍生产物稳定性结果（峰面积）

时间	0H	1H	2H	3H	平均	RSD (%)
低浓度甲醛衍生后产物	0.2834	0.2798	0.2813	0.2831	0.2819	0.6%
高浓度甲醛衍生后产物	0.8023	0.8146	0.8231	0.8049	0.8112	1.2%
液态水基类	0.7123	0.7237	0.7005	0.7185	0.7138	1.4%
膏霜乳液类	0.6463	0.6871	0.6638	0.6366	0.6585	3.4%
凝胶类	0.4338	0.4457	0.4372	0.4638	0.4451	3.0%

二、关于表25的解释

1、重新选取了20批样品进行测定，结果表明柱后衍生法结果均小于等于柱前衍生法的结果。

表9 柱前衍生法与柱后衍生法测得结果（μg/g）

编号	名称	柱后衍生法	柱前衍生法
1	相宜本草去死皮膏	93.40	101.05
2	相宜本草嫩白面膜	160.85	182.85
3	大宝 SOD 蜜	239.13	262.95
4	宗茂护颜柔肤水	2.37	4.825
5	优姿莱 水仙水润精萃原液	75.19	90.05
6	芦荟保湿甘油	209.59	231.1
7	欧美姿芦荟润透美肤水	120.42	134.44
8	百合高保湿润养水	261.57	352.4
9	蚕丝宝宝霜	77.45	83.96
10	孩儿面牛奶营养润肤露	176.27	234.95
11	SANNA	183.60	225.35
12	活力滋养面膜	63.58	89.65
13	茶水祛痘水	18.20	31.23
14	清爽水润沐浴乳	108.67	129.7
15	隆力奇宝宝润肤霜(新样)	35.68	49.83
16	隆力奇宝宝润肤霜(原样)	80.37	92.14
17	多芬沐浴露(新样)	88.13	95.9
18	多芬沐浴露(原样)	161.23	188.32
19	隆力奇 SOD 蜜(新样)	23.13	34.25
20	隆力奇 SOD 蜜(原样)	62.80	71.04

注：原样表示与编制说明中样品为同一样品，新样表示新购买的同品牌产品。

表 10（编制说明表 25） 阳性样品不同方法测定结果（ $\mu\text{g/g}$ ）

单位（ $\mu\text{g/g}$ ）	柱后衍生	柱前衍生
隆力奇宝宝润肤霜	71	51
金缕梅水	100	177
美素焕白亮肤水	329	395
大宝 SOD 蜜	244	319
多芬沐浴露	150	105
茶树祛痘水	5.5	28
百雀羚保湿霜	215	308
百雀羚滋养面霜	236	322
篮彩丽新面膜	62	112
婴儿沐浴露	130	208
隆力奇 SOD 蜜	50	34

2、原因分析

表 9 对不同生产日期的样品进行了测试（分别用原样及新样表示），结果表明，新样中游离甲醛测得结果小于原样测得结果，柱后衍生法结果均小于等于柱前衍生法结果。由此推断，编制说明表 25 中 3 个柱后衍生法的测得结果略高于柱前衍生法测得结果的原因，应该是由测定时间的差异引起的（这 3 批样品柱后衍生法测定时间与柱前衍生法测定时间相差 3-5 个月，在此期间由于甲醛释放体的存在而导致样品本底中的游离甲醛含量增加）。